

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SLEDOVÁNÍ POPULACE BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ V
MORAVSKÝCH VÍNECH

DIPLOMOVÁ PRÁCE

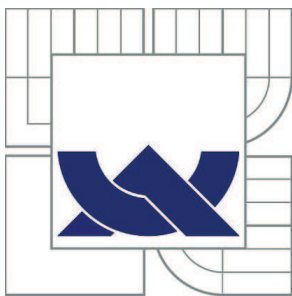
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

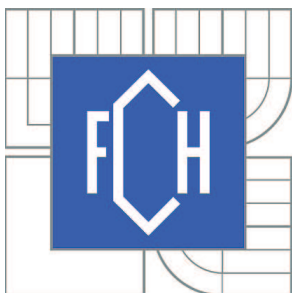
Bc. MARKÉTA VALICOVÁ

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SLEDOVÁNÍ POPULACE BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ V MORAVSKÝCH VÍNECH

THE MONITORING OF THE LACTIC ACID BACTERIA IN THE MORAVIAN WINES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

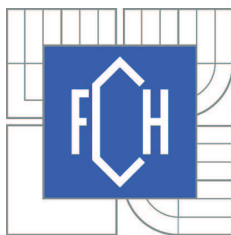
Bc. MARKÉTA VALICOVÁ

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JIŘINA OMELKOVÁ, CSc.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0556/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Markéta Valicová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Štěpánka Trachtová	

Název diplomové práce:

Sledování populace bakterií mléčného kvašení v moravských vínech

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité metody hodnocení
3. Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
4. Zhodnoťte získané výsledky formou diskus

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Markéta Valicová
Student(ka)

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem práce bylo monitorování celkového počtu bakterií mléčného kvašení vyskytujících se v hroznovém moštu během výroby vína. Studie byla provedena u odrůdy červeného vína Cabernet Moravia z ekologické vinice a odrůdy bílého vína Sauvignon jak z ekologické tak i integrované vinice. Součástí práce byla také izolace čistých kultur bakterií mléčného kvašení z kultur směsných a následně jejich identifikace pomocí rodově a druhově specifické PCR. Z experimentálních výsledků vyplývá, že na celkový počet kolonietvorných buněk bakterií mléčného kvašení má vliv nejen odrůda vína, zda se jedná o odrůdu červeného či bílého vína, ale také způsob pěstování vinné révy. Způsob pěstování vinné révy měl vliv i na druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení u jednotlivých odrůd.

ABSTRACT

The aim of this Master Degree Thesis was to monitor the total number of lactic acid bacteria occurring in grape must during wine production. The study was performed on the red wine grape variety Cabernet Moravia from organic vineyard and on the white wine grape variety Sauvignon from both organic and integrated vineyards. The isolation of pure cultures of lactic acid bacteria from mixed cultures and subsequently their identification by genus and species-specific PCR was also subject of the thesis. The experimental results show that the number of colony forming cells of lactic acid bacteria is influenced not only by the wine grape variety, whether it is a variety of red or white wine grape, but also by the way of wine growing. The method of wine growing also had an impact on the species representation of lactic acid bacteria in each variety.

KLÍČOVÁ SLOVA

víno, bakterie mléčného kvašení, ekologická a integrovaná vinice, jablečno-mléčné kvašení, polymerázová řetězová reakce

KEYWORDS

wine, lactic acid bacteria, organic and integrated vineyards, malolactic fermentation, polymerase chain reaction

VALICOVÁ, M. Sledování populace bakterií mléčného kvašení v moravských vínech. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 95 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem citovala správně a úplně. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala paní doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. a Ing. Štěpánce Trachtové za ochotu, laskavost, odborné a cenné rady, které mi usnadnily vypracování této diplomové práce.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1. Bakterie mléčného kvašení	9
2.1.1. Morfologie buněk bakterií mléčného kvašení	9
2.1.2. Cytologie	10
2.1.2.1. Buněčná stěna	10
2.1.2.2. Cytoplazmatická membrána	11
2.1.2.3. Cytoplazma	11
2.1.2.4. Bičíky	12
2.1.3. Rozmnožování bakterií	12
2.2. Metabolismus bakterií mléčného kvašení se zaměřením na malolaktické kvašení	13
2.2.1. Malolaktické kvašení	14
2.2.2. Vliv malolaktického kvašení na aromatický profil vína	16
2.3. Výroba vína	16
2.3.1. Vyzrálост a zdravotní stav	17
2.3.2. Zpracování hroznů na mošt	17
2.3.2.1. Mlýnkování hroznů	17
2.3.2.2. Odzrňování	18
2.3.2.3. Scezování	18
2.3.2.4. Lisování	18
2.3.3. Úpravy moštu	19
2.3.4. Kvašení moštu	19
2.3.5. Jablečno-mléčné kvašení	20
2.3.6. Ošetřování a školení vína	21
2.3.7. Integrovaná produkce hroznů a vína	21
2.3.7.1. Regulace škůdců	22
2.3.7.2. Regulace chorob	22
2.3.8. Ekologická produkce hroznů a vína	23
2.3.8.1. Regulace škůdců	23
2.3.8.2. Regulace chorob	23
2.4. Důležité rody bakterií mléčného kvašení při výrobě vína	24
2.4.1. Rod <i>Lactobacillus</i>	24
2.4.2. Rod <i>Pediococcus</i>	25
2.4.3. Rod <i>Oenococcus</i>	26
2.5. Mikrobiální interakce během výroby vína	27
2.5.1. Interakce mezi kvasinkami a bakteriemi mléčného kvašení	27
2.5.2. Interakce mezi bakteriemi mléčného kvašení	29
2.6. Identifikace bakterií ve víně pomocí polymerázové řetězové reakce	29
2.6.1. Polymerázová řetězová reakce	30
2.6.1.1. Princip PCR	30
2.6.1.2. Komponenty PCR	31
2.6.2. Detekce PCR produktů	33
2.6.2.1. Elektroforéza v agarosovém gelu	33

3. CÍL PRÁCE	34
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
4.1. Materiál	35
4.1.1. Použité bakteriální kmeny a DNA	35
4.1.2. Chemikálie	35
4.1.3. Kultivační média	36
4.1.4. Roztoky	36
4.1.4.1. Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk a izolaci bakteriální DNA.....	36
4.1.4.2. Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu	37
4.1.5. Komponenty pro PCR	38
4.1.6. Přístroje a pomůcky	38
4.2. Metody	38
4.2.1. Stanovení počtu buněk bakterií mléčného kvašení u odrůd vína	39
4.2.2. Izolace bakterií mléčného kvašení křížovým roztěrem na plotnu a čištěním pomocí jedné kolonie	39
4.2.3. Izolace DNA.....	40
4.2.3.1. Lyze buněk	40
4.2.3.2. Fenolová extrakce	40
4.2.3.3. Přesrážení DNA ethanolem	40
4.2.4. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	41
4.2.5. Agarosová gelová elektroforéza.....	41
4.2.5.1. Příprava agarosového gelu	41
4.2.5.2. Nanášení vzorků na gel, provedení gelové elektroforézy a barvení	41
4.2.6. Polymerázová řetězová reakce	42
4.2.6.1. PCR pro doménu <i>Bacteria</i>	42
4.2.6.2. Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> s purifikovanou DNA matricí ...	43
4.2.6.3. Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> z jedné bakteriální kolonie.....	44
4.2.6.4. Druhově specifické PCR	44
4.2.6.5. Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů.....	46
5. VÝSLEDKY	47
5.1. Sledování počtu bakterií mléčného kvašení ve vzorcích hroznového moštu během alkoholového kvašení u jednotlivých odrůd.....	47
5.1.1. Celkový počet bakterií mléčného kvašení během výroby červeného vína odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice	47
5.1.2. Celkový počet bakterií mléčného kvašení během výroby bílého vína u odrůdy Sauvignon z ekologické vinice.....	48
5.1.3. Výskyt bakterií mléčného kvašení během výroby bílého vína u odrůdy Sauvignon z integrované vinice	48
5.1.4. Srovnání celkového počtu bakterií mléčného kvašení u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice a odrůdy Sauvignon z ekologické a integrované vinice	49
5.2. Izolace čistých kultur bakterií mléčného kvašení.....	51
5.3. Identifikace izolovaných bakteriálních kmenů pomocí PCR.....	54
5.3.1. Kultivace bakterií pro izolaci DNA	54
5.3.2. Izolace DNA.....	54
5.3.3. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	56
5.3.4. Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> z 1 bakteriální kolonie	57

5.3.5. Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> s purifikovanou DNA matricí.....	59
5.3.6. Zařazení kmenů do rodu <i>Lactobacillus</i> na základě rodově specifické PCR s využitím různých DNA matric	61
5.3.7. PCR pro doménu <i>Bacteria</i>	62
5.3.8. Druhově specifická PCR pro <i>Oenococcus oeni</i>	63
5.3.9. Druhová identifikace bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> pomocí PCR	64
5.3.9.1. Druhově specifická PCR pro <i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	64
5.3.9.2. Druhově specifická PCR pro <i>Lactobacillus paracasei</i>	66
5.3.9.3. Optimalizace druhově specifické PCR pro druh <i>Lactobacillus plantarum</i>	67
5.3.9.4. Druhově specifická PCR pro <i>Lactobacillus plantarum</i>	69
5.3.9.5. Optimalizace druhově specifické PCR pro druh <i>Lactobacillus fermentum</i>	71
5.3.9.6. Druhově specifická PCR pro <i>Lactobacillus fermentum</i>	73
5.3.9.7. Zařazení kmenů KIV1 – KIV39 do druhů na základě druhově specifických PCR	75
5.4. Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení při výrobě vína u jednotlivých odrůd	77
5.4.1. Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice	77
5.4.2. Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení u odrůdy Sauvignon z ekologické vinice	77
5.4.3. Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení u odrůdy Sauvignon z integrované vinice	78
5.4.4. Srovnání druhového zastoupení bakterií mléčného kvašení u jednotlivých odrůd vína během alkoholového kvašení	79
6. DISKUSE	81
6.1. Sledování počtu a druhového zastoupení bakterií mléčného kvašení u jednotlivých odrůd vína během alkoholového kvašení	81
6.1.1. Srovnání celkového počtu bakterií mléčného kvašení u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice a odrůdy Sauvignon z ekologické a integrované vinice	81
6.1.2. Srovnání druhového zastoupení bakterií mléčného kvašení u jednotlivých odrůd vína během alkoholového kvašení	82
6.2. Kultivace bakterií pro izolaci DNA	83
6.3. Izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR	83
6.4. Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i>	84
6.5. PCR pro doménu <i>Bacteria</i>	84
6.6. Druhově specifické PCR	85
7. ZÁVĚR	86
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	88
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	93
10. PŘÍLOHY	95

1. ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou pro jejich dobře zdokumentované fermentační a zdraví prospěšné vlastnosti považovány za nejdůležitější skupinu bakterií. Jsou tvořeny heterogenní skupinou grampozitivních bakterií s přísně fermentačním metabolismem, jehož klíčovým metabolitem je kyselina mléčná. Přirozeným prostředím těchto organismů je člověk, zvířata i rostliny. Bakterie mléčného kvašení jsou zodpovědné za významnou rozmanitost v chuti a textuře potravinářských výrobků způsobenou fermentací potravinářských surovin. Nicméně v některých případech mohou způsobit znehodnocení potravin. Kvašení potravin, spolu se sušením a solením, je jedním z nejstarších známých konzervačních postupů. Fermentované potraviny jsou méně náchylné ke kažení než původní suroviny, jejich nutriční hodnota může být zvýšena a bezpečnost těchto potravin může být zvýšena díky inhibici patogenních bakterií nízkým pH a přítomností organických kyselin a antimikrobiálních sloučenin [1, 2].

Výroba vína může být shrnuta jako biotransformace moštu na víno, která je vykonána především prostřednictvím kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* během primárního neboli alkoholového kvašení. Často je také povzbuzováno sekundární kvašení, tzv. malolaktické kvašení, které zajišťuje biologické odkyselení vína a zvyšuje tak jeho stabilitu a kvalitu. Malolaktické kvašení obvykle probíhá po alkoholovém kvašení, ale může probíhat i současně s primárním kvašením. Během tohoto kvašení bakterie mléčného kvašení metabolizují jablečnou kyselinu za vzniku kyseliny mléčné a CO₂ [3]. Druhy bakterií mléčného kvašení izolovaných z vína patří do rodů *Lactobacillus*, *Oenococcus* a *Pediococcus*, přesto je malolaktické kvašení převážně řízeno druhem *Oenococcus oeni* (dříve *Leuconostoc oenos*) [4].

Vzhledem k důležité roli bakterií mléčného kvašení ve vinařství je velký zájem o identifikaci těchto mikroorganismů. Fyziologické a biochemické testy pro identifikaci druhů mléčných bakterií jsou často nejednoznačné, protože většina mléčných bakterií má velmi podobné požadavky na výživu a rostou za podobných ekologických podmínek. Z tohoto důvodu mohou být často obtížně identifikovány na úrovni druhu na základě jednoduchých fenotypových testů [5].

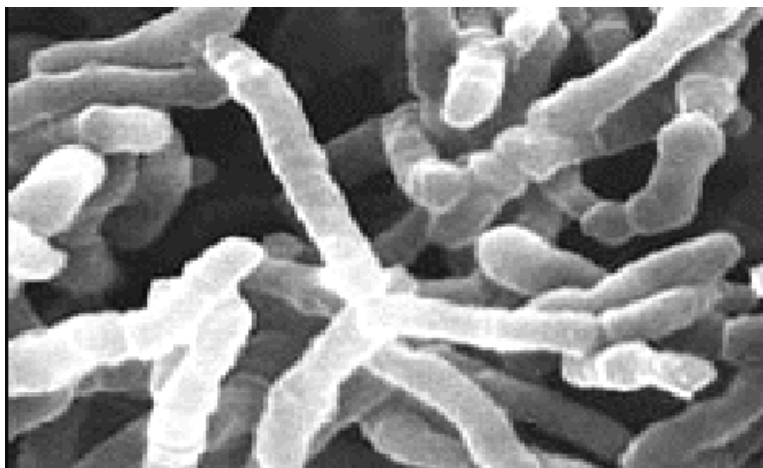
V posledních dvou desetiletích jsme byli svědky vývoje nových molekulárních technik založených na podobnosti nebo odlišnosti DNA, RNA nebo proteinů. Tyto genotypové techniky vykazují různý stupeň diskriminační síly, od druhového rozlišení po jednotlivé kmeny. Jednou z hlavních výhod těchto metod je jejich nezávislost na změně růstových podmínek mikroorganismů. Patří mezi ně zejména polymerázová řetězová reakce a její různé modifikace jako je nested-PCR, RAPD, RFLP, rep-PCR nebo DNA-DNA hybridizace, sekvenování atd. [1, 5].

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1. Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení jsou různorodou skupinou grampozitivních, nesporulujících, kataláza negativních bakterií. Jsou chemoorganotrofní a odbourávají hexózy na laktát (homofermentativní) nebo na ekvimolární množství laktátu, etanolu nebo acetátu a CO₂ (heterofermentativní). Mléčné bakterie kolonizují rostliny, nacházejí se v čistírnách odpadních vod, genitáliích, intestinálním a respiračním traktu člověka a zvířat a ve fermentovaných potravinách a nápojích (např. mléčné výrobky, maso, ryby, zelenina, kynuté těsto, pivo a víno). Při výrobě vína pocházejí z bobulí hroznu a sklepního zařízení. Některé bakterie mléčného kvašení jsou zodpovědné za jablečno-mléčné kvašení, sekundární fermentaci, která snižuje kyselost, zvyšuje mikrobiologickou stabilitu a zlepšuje organoleptické vlastnosti vína. Jsou však rovněž zodpovědné za některé vady vína jako je vláčkovitost, kažení, mannitol atd. [5].

Bakterie mléčného kvašení, významné při výrobě vína, jsou podle Bergeyho manuálu [6] zařazeny jednak do čeledi *Leuconostocaceae*, rodu *Oenococcus* a do čeledi *Lactobacillaceae*, rodů *Lactobacillus* a *Pediococcus*.



Obr. č. 1: Mikroskopický snímek bakterie *Oenococcus oeni* [7]

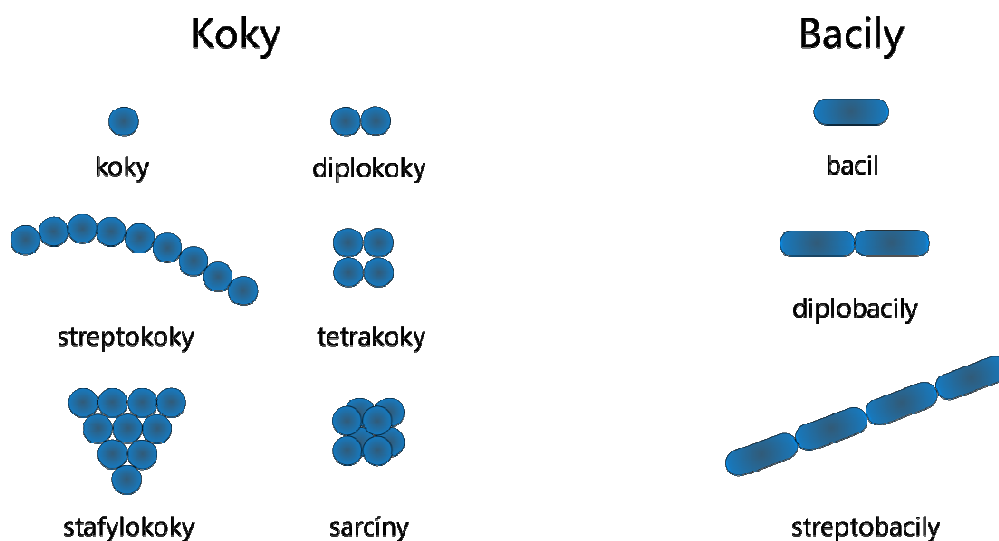
2.1.1. Morfologie buněk bakterií mléčného kvašení

Všechny skupiny bakterií mají charakteristický tvar a velikost. Tvar mléčných bakterií je poměrně stálá vlastnost a patří mezi základní kritéria při klasifikaci těchto mikroorganismů [8].

Tvar buněk bakterií je nejčastěji tyčinkovitý (bacily), méně často kulovitý (koky). Tyčinkovité buňky jsou buď rovné, zakřivené, tvaru pravidelné spirály nebo dlouhé nepravidelné spirály (Obr. č. 2) [9]. Délka spirály závisí na kultivačních podmínkách, zejména na aciditě, teplotě, obsahu alkoholu, rychlosti rozmnožování apod. [8].

Kulovité vegetativní buňky bakterií se nazývají koky. Jestliže se rozmnožují dělením pouze v jedné rovině, tvoří řetízky (streptokoky), při dělení ve dvou na sebe kolmých

rovinách vytvářejí většinou tetrády, při dělení ve třech na sebe kolmých rovinách tvoří pravidelné balíčky po osmi až několika stech buňkách (sarcíny). Dělením koků v různých rovinách vznikají nepravidelné shluky buněk (stafylokoky) (Obr. č. 2) [8].



Obr. č. 2: Tvary bakterií

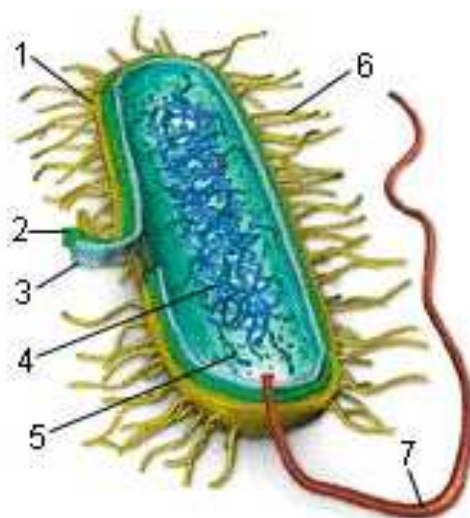
2.1.2. Cytologie

Cytologie, neboli buněčná biologie, je věda zabývající se buněčnou strukturou a morfologií strukturních složek buňky. Na povrchu bakteriální buňky (Obr. č. 3) se vyskytuje buněčná stěna, pod ní cytoplazmatická membrána uzavírající vlastní buněčnou hmotu cytoplazmu. V cytoplasmě se nachází jaderný aparát, také zvaný jaderný ekvivalent (nukleoid) tvořený u bakterií jedinou molekulou deoxyribonukleové kyseliny. Dále cytoplazma obsahuje ribozomy, inkluze, plazmidy a mesozomy. Na povrchu buněk se mohou vyskytovat orgány pohybu bičíky (flagela) [10].

2.1.2.1. Buněčná stěna

Každá mikrobiální buňka je od vnějšího prostředí oddělena silnou, pevnou, většinou neohebnou (rigidní) strukturou, zvanou buněčná stěna. Buněčná stěna dává mikrobiální buňce tvar a chrání ji před mechanickými vlivy a před účinky osmotického tlaku vnějšího prostředí [9].

Jak již bylo zmíněno jsou mléčné bakterie grampozitivní, tzn. že hlavní složkou jejich buněčné stěny je silná peptidoglykanová vrstva, která je jako tmelem vyplněna teichovou kyselinou, lineárním polymerem složeným z polyglycerolfosfátu nebo polyribitolfosfátu. Teichová kyselina je vázána kovalentní vazbou na muramovou kyselinu a představuje až 50 % sušiny buněčné stěny grampozitivních bakterií. Kromě teichové kyseliny jsou na peptidoglykan grampozitivních bakterií vázány ještě polysacharidy složené z glukosy, galaktosy, mannosy a některých dalších monosacharidů [9, 11].



Obr. č. 3: Struktura bakteriální buňky [12]

1 – pouzdro, 2 – buněčná stěna, 3 – cytoplazmatická membrána, 4 – jaderný materiál, 5 - ribozomy, 6 – fimbrie, 7 - bičík

2.1.2.2. Cytoplazmatická membrána

Pod buněčnou stěnou je uložena jemná elastická membrána s malými póry, tzv. cytoplazmatická membrána. Její tloušťka je 5 – 10 nm a skládá se z fosfolipidů a proteinů, přičemž proteiny představují 50 – 70 % její sušiny [9, 11]. Z cytoplazmatické membrány bakterií vybíhají do cytoplazmy vychlípeniny, jejichž počet a velikost jsou závislé na druhu bakterií. U některých druhů jsou tyto vychlípeniny zastoupeny v hojném počtu, u jiných je jen jeden nebo dva. Zvláštním typem těchto vychlípenin jsou mesozomy, které se vyskytují hlavně poblíž oblasti, kde se při dělení buňky tvoří přepážka [9].

Cytoplazmatická membrána je sídlem dýchacích enzymů, systému oxidační fosforylace, enzymů syntézy a hydrolýzy fosfolipidů a konečné fáze syntézy složek buněčné stěny a pouzdrových obalů. Jsou v ní také přítomny bílkovinné přenašeče, nutné pro transport látek do buňky a z buňky [9].

2.1.2.3. Cytoplazma

Cytoplazma bakteriálních buněk je tvořena vodným prostředím, ve kterém jsou obsaženy makromolekuly typu proteinů (enzymů), mRNA a tRNA, malé molekuly – energetické zdroje, prekursor makromolekul, metabolity nebo vitamíny, třetí skupinu tvoří různé anorganické látky, kofaktory [13].

Jaderný materiál bakterií tvoří deoxyribonukleová kyselina (DNA) umístěná přímo v cytoplazmě a doprovázená malým množstvím polyamidů. DNA bakterií tvoří chromozom, který má uzavřenou strukturu takže si jej zjednodušeně můžeme představit jako kružnici. Molekula DNA má u bakterií, podobně jako u ostatních organismů, tvar dvojité šroubovice, tj. šroubovice tvořené dvěma paralelními řetězci, jež jsou vzájemně spojeny vodíkovými

můstky. Je to polynukleotid obsahující dvě purinové (adenin a guanin) a dvě pyrimidinové báze (thymin a cytosin) [9].

Ribozomy bakterií, v nichž probíhá syntéza bílkovin, jsou menší (10 – 20 nm) než ribozomy eukaryotních mikroorganismů. Jsou složené ze dvou podjednotek – malé podjednotky (sedimentační konstanta 30S) a velké podjednotky (sedimentační konstanta 50S), které se spojují do funkční jednotky 70S. Každá podjednotka se skládá z ribozomální RNA neboli rRNA a bílkovin. Na ribozomální podjednotce 50S se nachází několik vazebných míst. Je to především aminoacylové místo (A), peptidylové místo (P) a elongační místo (E). Tato vazebná místa hrají velkou roli v genové expresi, především v translaci [11, 14].

Velká řada bakterií obsahuje v buňce kromě chromozomální DNA ještě několik samostatných molekul DNA, uzavřené struktury, ale mnohem nižší molekulové hmotnosti, zvané plasmidy. Jejich jednu skupinu tvoří tzv. konjugativní faktory, které se uplatňují při spájení neboli konjugaci buněk [9].

Poslední součástí cytoplazmy jsou buněčné inkluze, které mohou představovat její podstatnou část, obvykle představují zásobní materiál, např. glykogen, polymer složený z glukózy, nebo kyselinu poly- β -hydroxymáselnou jako zdroj energie. Polyfosfátové inkluze představují depotní formu fosforu ve formě fosforečnanů. Cytoplazma některých fototrofních a lithotrofních bakterií obsahuje inkluze tvořené sírou, která slouží rovněž jako zdroj energie [14].

2.1.2.4. Bičinky

Některé tyčinkovité bakterie mají na svém povrchu jeden nebo více bičků, jež umožňují jejich pohyb. Bičky jsou dlouhá tenká vlákna složená z bílkoviny flagelinu. Podle počtu a umístění bičků rozdělujeme bakterie na monotricha, které mají biček na jednom pólu buňky, lofotricha, jež mají po svazku bičků na jednom nebo obou pólech buňky, a peritricha, u nichž je celý povrch buněk pokryt bičky. Bakterie netvořící bičky se nazývají atricha [9].

Bičky nejsou sice pro život buňky nezbytné, umožňují však aktivní pohyb buňky ke zdroji živin, kyslíku apod. Hnací silou rotačního pohybu bičků je elektrochemický potenciál vznikající na cytoplazmatické membráně v důsledku metabolismu buňky [9].

2.1.3. Rozmnožování bakterií

Většina bakterií se rozmnožuje dělením. Dělení je charakterizováno tím, že ve střední části buňky začne z cytoplazmatické membrány vyrůstat prstencovitá vychlípenina směřující dovnitř buňky, až vytvoří přepážku rozdělující buňku na dvě zhruba stejně velké části. Přepážka se pak pokryje buněčnou stěnou, takže z původní jedné buňky vzniknou buňky dvě, jež se od sebe buď oddělí, nebo zůstanou spojeny v řetízku. Jenom několik rodů bakterií se rozmnožuje pučením. Při pučení má dceřiná buňka zpočátku velmi malé rozměry a postupně dorůstá. S mateřskou buňkou je přitom stále spojena pouze úzkým krčkem, který je u některých druhů velmi dlouhý [9].

Rozdělení bakteriální buňky vždy předchází replikace chromozomální DNA. U pomalu se rozmnožujících buněk je mezi jednotlivými replikačními cykly DNA časový interval, v němž dochází k syntéze bílkovin a ostatních složek buňky. Replikace DNA začíná pak tehdy, když

buňka dosáhne určitou velikost, tzn. když poměr buněčných bílkovin k DNA dosáhne určité hodnoty [11]. U pomalu se rozmnožujících buněk se tedy rozlišuje při dělení několik fází:

1. G1-fáze, při níž je v buňce jen jeden genom (tj. jeden soubor genů) a kdy probíhá syntéza bílkovin a ostatních buněčných složek.
2. S-fáze, kdy se syntetizuje DNA a část genomu se vyskytuje již dvakrát, přičemž syntéza ostatních složek buňky pokračuje.
3. G2-fáze, při níž jsou v buňce dva genomy a začíná se syntetizovat přepážka oddělující mateřskou a dceřinou buňku.

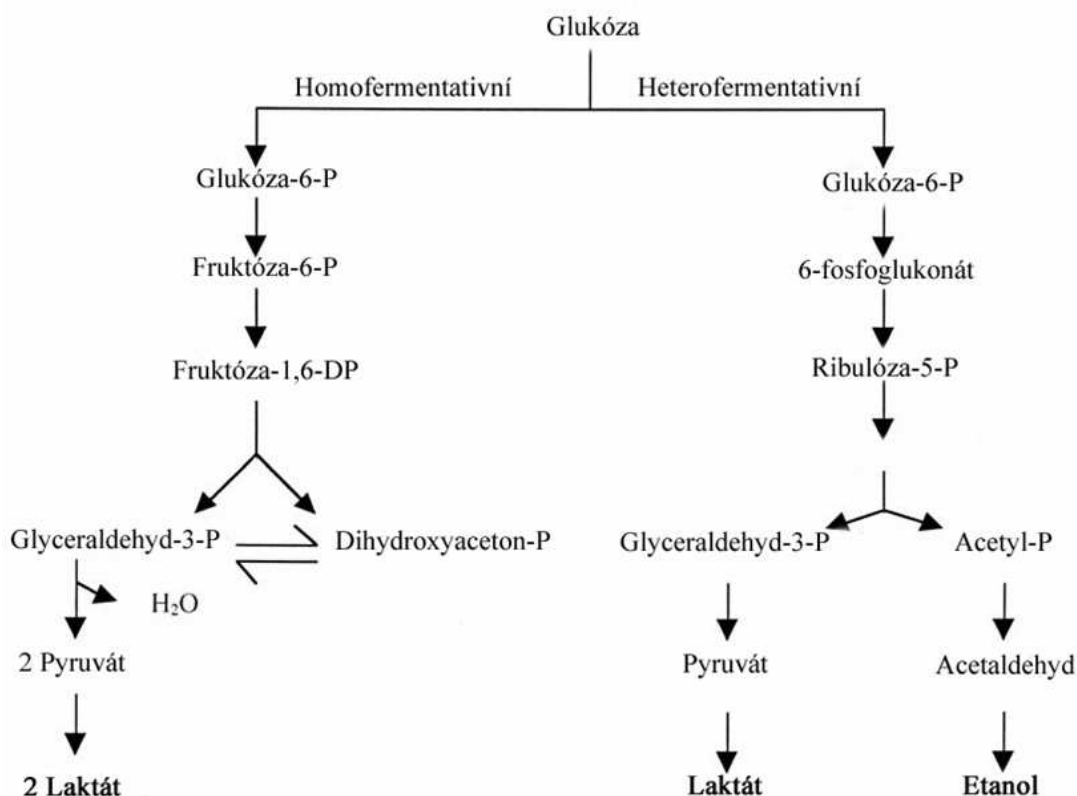
Po ukončení replikace celé molekuly DNA (tedy jednoho cyklu replikace) se obě molekuly DNA oddělí neboli segregují. Na této segregaci se pravděpodobně podílí syntéza cytoplazmatické membrány buňky, neboť chromozom je svým iniciačním bodem na ni napojen [9].

Celková doba od vzniku dceřiné buňky k jejímu dalšímu rozdělení se nazývá generační doba. Jedná se tedy o dobu, za níž dojde ke zdvojnásobení počtu buněk a většinou zhruba také ke zdvojnásobení buněčné hmoty [9].

2.2. Metabolismus bakterií mléčného kvašení se zaměřením na malolaktické kvašení

Bakterie mléčného kvašení získávají energii zejména kvašením sacharidů za vzniku kyseliny mléčné a to jednou ze dvou rozdílných drah (Obr. č. 4), což nám poskytuje užitečný identifikační znak při jejich klasifikaci. Homofermentativní bakterie mléčného kvašení produkují kyselinu mléčnou jako prakticky jediný produkt fermentace glukózy. Následují Emden-Meyerhof-Parnasovu glykolytickou dráhu, kdy je šestiuhlíkatá molekula glukózy fosforylována a izomerizována před vlastním štěpením enzymem aldolázou na glyceraldehyd-3-fosfát a dihydroxyaceton-3-fosfát. Glyceraldehyd-3-fosfát je pak přeměňován na pyruvát. Během těchto přeměn dochází na dvou místech ke vzniku ATP, aby celkový zisk na každou molekulu glukózy byly dvě molekuly ATP. Za účelem regenerace NAD^+ spotřebovaného na oxidaci glyceraldehyd-3-fosfátu, je pyruvát redukován na laktát pomocí NADH oxidáz [15].

Heterofermentativní bakterie mléčného kvašení produkují při kvašení glukózy ekvimolární množství kyseliny mléčné, etanolu/acetátu a oxidu uhličitého. Nemají enzym aldolázu. Z tohoto důvodu transformují hexózu na pentózu sledem reakcí zahrnujících oxidace a dekarboxylace. Pentóza je poté štěpena enzymem fosfoketolázou na glyceraldehyde-3-fosfát a acetyl-fosfát. Trióza-3-fosfát je poté přeměněna na laktát stejným sledem reakcí jako se vyskytuje v glykolýze za vzniku dvou molekul ATP. Osud acetyl-fosfátu závisí na množství dostupných akceptorů elektronů. V případě nedostatku plní funkci akceptoru elektronů a je redukován na etanol za současné regenerace dvou molekul NAD^+ . V přítomnosti kyslíku může být NAD^+ regenerován NADH oxidázami a peroxidázami takže acetyl-fosfát je k dispozici pro převod na acetát. To poskytuje další možnost pro fosforylaci na substrátové úrovni a tedy zvyšuje celkový výnos ATP heterofermentativního kvašení z jedné molekuly na dvě molekuly ATP na molekulu glukózy. Stejného účinku lze dosáhnout s jinými akceptory elektronů, např. fruktózou, která je redukována na mannitol [15].



Obr. č. 4: Obecné schéma fermentace glukózy u bakterií mléčného kvašení [16]

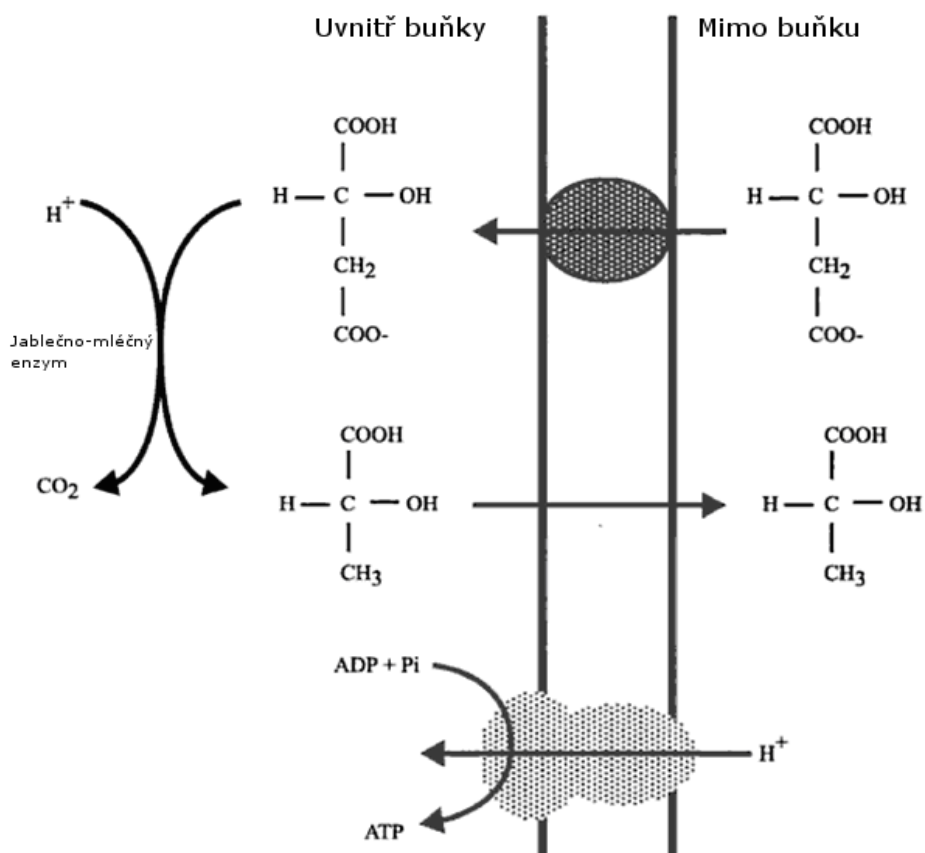
2.2.1. Malolaktické kvašení

Malolaktické kvašení, které se uskutečňuje pomocí bakterií mléčného kvašení, nejčastěji probíhá po alkoholovém kvašení, ale může k němu dojít i současně s primárním kvašením. Během malolaktického kvašení je jablečná kyselina dekarboxylována na kyselinu mléčnou a CO_2 . Důsledkem činnosti BMK, které řídí malolaktické kvašení, se zlepšuje kvalita vína, organoleptické vlastnosti a mikrobiologická stabilita vína před jeho plněním do láhví. Druhy bakterií mléčného kvašení izolovaných z vína patří do rodů *Lactobacillus*, *Oenococcus* a *Pediococcus*, přesto je malolaktické kvašení převážně řízeno druhem *Oenococcus oeni* (dříve *Leuconostoc oenos*) [4].

Prvotní studie ukázaly, že malolaktické kvašení je dekarboxylace katalyzovaná NAD^+ specifickým jablečným enzymem vyžadujícím Mn^{2+} ionty. Tento enzym byl jako první izolován z bakterie *Lactobacillus plantarum* a později i z jiných bakterií mléčného kvašení. Biochemické výhody malolaktického kvašení pro mikroorganismus byly nejdříve nejasné, protože nebyl zjištěn žádný zjevný ATP ani jiná přímá energie. Během přeměny jablečné kyseliny na mléčnou nevzniká pyruvát jako meziprodukt, což vedlo vědce k předpokladu, že funkcí malolaktického kvašení není získání energie. Poté bylo ale zjištěno, že jablečno-mléčné kvašení urychluje růst *O. oeni* a stimuluje využívání zdrojů uhlíku bakteriemi mléčného kvašení. Také bylo prokázáno, že malolaktické kvašení poskytuje ATP a bylo navrženo, že schopnost buněk transportovat laktát a protony prostřednictvím symportu by teoreticky mohlo vytvářet proton motivní gradient, který vede ke vzniku ATP prostřednictvím

membránově vázané ATPázy. Nicméně se nenašlo dostatek důkazů pro laktát/proton symport u *O. oeni* [17].

Později bylo zjištěno, že při nízké hodnotě pH tok laktátu během malolaktického kvašení nevede ke vzniku ATP. Místo toho bylo tedy navrženo, že ATP vznikající během katabolismu malátu je spojeno s proton motivním gradientem vytvořeným během transportu malátu a difúze mléčné kyseliny [17]. Tento návrh podpořil Poolman [18], který dokázal, že *Lactococcus lactis* produkuje proton motivní gradient vytvořený z membránového potenciálu a pH gradientu přes elektrogenní vychytávání malátu, společně se spotřebou protonů jako výsledkem dekarboxylace L-malátu (Obr. č. 5). V roce 1994 Salema a kol. [19] navrhl model ukazující vychytávání malátu v monoaniontové formě (dominantní forma při nízkém pH) prostřednictvím uniportu, což by způsobilo, že záporný náboj by byl přesunut dovnitř a tím by vznikl elektrický potenciál. L-jablečná kyselina je pak dekarboxylována za vzniku mléčné kyseliny a CO₂ uvnitř buňky v reakci, která vyžaduje jeden proton. Spotřeba protonu v cytoplasmě by pak generovala pH gradient, který by spolu se změnou elektrického potenciálu vytvářel proton motivní gradient napříč cytoplazmatickou membránou. K tvorbě ATP by pak došlo prostřednictvím membránově vázané ATPázy. Salema a kol. [19] taktéž navrhli, že L-mléčná kyselina a CO₂ opouštějí buňku spíše jako neutrální částice než aktivním transportem. Pozdější práce Salema a kol., kdy byl proton motivní gradient vytvořen *in vitro* působením elektrogenního uniportu ve spojení se spotřebou protonu dekarboxylací L-jablečné kyseliny, potvrdila tento model [17, 20].



Obr. č. 5: Navržený model tvorby energie (ATP) prostřednictvím přeměny kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou a oxid uhličitý (podle Poolmana) [17]

2.2.2. Vliv malolaktického kvašení na aromatický profil vína

Kromě samotného odkyselení může mít malolaktické kvašení vliv na senzorické vlastnosti vína produkcí mnoha sloučenin, které významně ovlivňují aroma a chuť. Ačkoliv přesný příspěvek jablečno-mléčného kvašení na výslednou chuť vína je stále diskutabilní, je známo, že *O. oeni* vytváří ve víně chuťové a aromatické látky. Jednou z nejdůležitějších je 2,3-butandion nebo diacetyl. Diacetyl má výrazné máslové aroma a je syntetizován vinnými bakteriemi mléčného kvašení z citrátu nebo jiných sacharidů přes pyruvát. Smyslové prahové hodnoty se pohybují od 0,2 mg/l ve víně Chardonnay do 0,9 mg/l v Pinot Noir, 2,8 mg/l v Cabernet Sauvignon. Konečná koncentrace ve víně je ovlivněna celou řadou faktorů včetně bakteriálního kmene, druhu vína a redoxního potenciálu. Přítomnost diacetylu ve víně v nízké koncentraci (1 – 3 mg/l) je sensoricky popisována jako máselná nebo ořechová, ale při vyšší koncentraci (5 – 7 mg/l) bude tato sloučenina dominovat ve vinném aroma, což vede ke znehodnocení [17].

O. oeni produkuje kromě diacetylu i estery, sensoricky aktivní látky taktéž důležité pro chuť a aroma vína. Estery jsou v první řadě syntetizovány kvasinkami rodu *Saccharomyces* v průběhu alkoholového kvašení, ale ukázalo se, že estery, jako je ethylacetát, ethyllaktát, ethylhexanoát a ethyloktanoát mohou být syntetizovány bakteriemi *O. oeni* [17].

Bakterie *O. oeni* mohou taktéž ovlivnit chuť vína díky uvolnění monoterpenů. Tyto chuťové sloučeniny jsou často přítomné v hroznech a víně jakožto neprchavé glykozylované sloučeniny bez chuti (postrádající chuť). Uvolnění monoterpenů je důležité pro rozvoj určitého vinného aroma, nicméně hydrolyza monoglykozidů vyžaduje působení β -glykozidázy. Je známo, že vinné kvasinky, zejména kvasinky jiného rodu než *Saccharomyces*, mají glykozidickou aktivitu. Rovněž některé kmeny *O. oeni* mají β -glykozidickou aktivitu a tedy hydrolyzují glykokonjugáty a mění senzorické vlastnosti vína [17].

O. oeni může taktéž ovlivnit koncentraci aldehydů, jako je acetaldehyd. Acetaldehyd je nejhojněji se vyskytující aldehyd ve víně, ovlivňující aroma, zrání a barevnou stálost. *O. oeni* může metabolizovat acetaldehyd za vzniku etanolu a kyseliny octové. Rozklad acetaldehydu může být v některých případech žádoucí, protože nadbytek způsobuje ve víně netypické aroma. V jiných případech je nežádoucí, protože tato sloučenina hraje roli ve vývoji barvy červených vín [17].

2.3. Výroba vína

V průběhu historického vývoje zpracování hroznů na víno se vyvinula řada technologických postupů v souladu s lokalitou, druhem pěstovaných odrůd, technickými možnostmi a společenskými tradicemi a zvyklostmi. Jednotlivé technologie se často výrazně liší a umožňují výrobu široké palety různých druhů a značek vín. Základní principy zpracování vinné révy na víno jsou dostatečně patrné z technologie dvou základních, tj. bílých a červených vín, které se odlišují zejména v počátečních fázích technologického postupu [21].

2.3.1. Vyzrálост a zdravotní stav

Výroba vína začíná sklizní. Hrozny révy vinné v našich klimatických podmínkách a zeměpisné poloze dozrávají koncem srpna, v září a začátkem října, kdy se sklízají, s výjimkou pozdních a ledových sběrů. Období sklizně hroznů se nazývá vinobraní. Hrozny se sklízají v našich vinařských oblastech v plné zralosti, neboť vína z předčasně sklizených hroznů jsou zpravidla kyselá s drsnou a neharmonickou chutí. Je-li podzim suchý a teplý, nechávají se hrozny zrát co nejdéle, aby se dosáhlo co nejvyšší cukernatosti [21]. V zasychajících bobulích se obsah cukru zvyšuje a obsah kyselin prodyšáním snižuje. Dotváří se odrůdový charakter, zintenzivňuje se tvorba aromatických látek [22].

Na konci dozrávání se vlivem obdělávání půdy, rozšíření různých chorob a větrného počasí usazují na povrchu bobulí a třapin různé půdní částice, vegetativní orgány plísní, hub a průmyslové exhaláty. Nejsou zanedbatelné ani postřikové látky, které se v zájmu ochrany révy před chorobami nanášejí na povrch bobulí a za suchého počasí na nich zůstávají až do sběru. Hrozny jsou také mnohokrát postihnuté krupobitím a hmyzem, což znehodnocuje mošt a ohrožuje kvalitu budoucího vína [22].

Aby vína měla dostatek alkoholu potřebného na zaručení jejich stability, je důležité zajistit v moštích dostatek cukru. Z hlediska aerobních mikroorganismů, zejména bakterií, nejen před kvašením, ale i v průběhu kvašení a dokvašení moštů, je třeba zabezpečit obsah alkoholu od 11 – 13 % obj. Současně je třeba zajistit inaktivaci oxidačních enzymů a ochranu celé řady vitamínů a buketvorných sloučenin během zpracování hroznů [22].

2.3.2. Zpracování hroznů na mošt

Přírodní bílá vína se vyrábějí ze žlutých, růžových, červených odrůd, přírodní červená vína z modrých odrůd. Sklizené hrozny se dopravují do zpracovatelských závodů. Při skládce hroznů se zjišťuje hmotnost, průměrná cukernatost a jakost podle zdravotního stavu, odrůdy a obsahu cukru. K zjišťování cukernatosti slouží speciální moštoměry, kterých se používá několik druhů [21].

K získání kvalitního čistého moštu požadované jakosti se hrozny zpracovávají různými operacemi, jako je mlýnkování, odzrňování, scezování a lisování. Všechny tyto procesy se provádějí v lisovně [21].

2.3.2.1. Mlýnkování hroznů

V procesu mlýnkování dochází k rozdrcení bobule a provzdušnění získaného rmutu. Mlecí zařízení musí být sestavené tak, aby se bobule dostatečně rozemlely, avšak aby se neporušily semena a třapiny. Nedostatečně rozdrcené bobule výrazně snižují výtěžek moštu, porušení semen a třapin snižuje kvalitu budoucího vína. Provzdušnění dužniny je důležité z hlediska podpoření intenzity rozmnožení kvasinek na začátku kvašení. Na druhé straně však podporuje nadměrnou tvorbu oxidačních enzymů [22]. Mletí se dělá různými typy mlýnků – válcovými, bubnovými, kladívkovými a odstředivými. Nejrozšířenější jsou válcové mlýnky. Při použití některých typů odzrňovačů se mlýnkování nemusí dělat [21].

2.3.2.2. Odzrňování

Odzrňování slouží k odstranění třapin z rmutu, aby do moštu nepřecházely nežádoucí látky. Odzrňování se dělá na různých typech vystíracích či odstředivých odzrňovačů, v nichž se v perforovaném válci zachycují třapiny, kdežto rmut jím protéká do sběrné nádrže. Vína z odzrňovaných rmutů jsou chuťově jemnější a jakostnější. Hůře se však lisují a pomaleji se čistí, neboť obsahují méně tříslovin. Pro zlepšení lisovatelnosti se přidávají pektolytické enzymové preparáty [21].

2.3.2.3. Scezování

Scezování může být samostatnou technologickou operací nebo je součástí lisovacího procesu. Slouží k oddělení nejkvalitnější části moštu, která se nazývá samotok. Provádí se ihned po předchozí operaci, aby se předešlo okysličení moštu a jeho obohacení tříslovinami vyluhujícími se z třapin [21].

2.3.2.4. Lisování

Lisování má za účel oddělení šťávy, která byla uvolněna z buněk předchozími technologickými operacemi. Rmuty se lisují v lisech různých konstrukcí. Používají se periodické i kontinuální lisy, hydraulické i pneumatické lisy. Lisuje se pozvolna s občasným přerušením, aby výtěžek moštu byl co největší. Při použití vysokovýkonných kontinuálních lisů se do moštu může dostat následkem většího tlaku více nečistot, což snižuje kvalitu vína [21, 23].

Rmut ze světlých hroznů pro výrobu bílého vína se lisuje ihned. Při zpracování silně aromatických světlých i při zpracování modrých hroznů a při výrobě červených vín se před lisováním rmut nakvašuje [21].

Barevnost a chuťový projev červených vín způsobují polyfenoly, z nichž jsou to antokyany, třísloviny, katechiny, kondenzované třísloviny a leukoantokyany. Nacházejí se v podstatě ve všech částech hroznů modrých kultivarů révy. Hlavním požadavkem u červených vín je, aby obsahovaly v první řadě dostatečné množství červeno-fialových antokyanů, které dávají červeným vínům esenciální projev, dále třísloviny a katechiny. Extrakce polyfenolů z pevných částí bobulí se nejspolehlivěji dosáhne alkoholovým nakvašením rozemletého mláta modrých kultivarů révy. Během tvorby alkoholu nastává rozrušování buněčných struktur slupky, přičemž vznikající alkohol spolu s kyselinami za účinku pektolytických enzymů uvolňují polyfenoly do rozkvašených moštů. Tento proces urychluje rychlost tvorby alkoholu [22].

Nakvášení trvá všeobecně 4 až 8 dní, a to v závislosti na rychlosti kvašení, intenzitě míchání, teplotě apod. Proces nakvášení se proto musí pravidelně denně sledovat, přičemž se senzoricky kontroluje stupeň prokvašení, obsah barviv a tříslovin i celkový zdravotní stav [22].

2.3.3. Úpravy moštu

K dosažení optimální kvality moštu, zaručující hladký průběh kvašení a vysokou jakost vyrobeného vína, je třeba mošt získaný lisováním dodatečně upravovat. V praxi se provádí odkalování, provzdušňování, síření, úprava kyselosti a cukernatosti moštu [21, 24, 25].

Odkalování moštu slouží k oddělení hrubých kalů a nečistot, s nimiž se částečně strhávají i kontaminující mikroorganismy. Odkalují se mošty z kontinuálních lisů a mošty z mechanicky a mikrobiálně poškozených hroznů [21, 24].

Provzdušňování se dělá u zdravých moštů skladovaných v nepropustných tancích a nádržích. Prosycení moštu kyslíkem je nezbytným předpokladem dobré činnosti kvasinek [21, 24].

Síření slouží k ochraně moštů před bakteriální a plísňovou kontaminací, před oxidací a před jinými vadami. Síří se oxidem siřičitým dávkou 25 – 50 mg/l. V praxi se síří všechny mošty, aby se předešlo chorobám a vadám vína. Oxid siřičitý potlačuje činnost nežádoucích mikroorganismů, zejména bakterií a divokých kvasinek a současně příznivě ovlivňuje senzorický charakter následného vína podporou tvorby glycerolu [21].

Víno z nedozrálých hroznů je tvrdé, neharmonicky kyselé, které velmi pozdě vytrává. Pokud dle látkového rozboru je obsah veškerých titrovatelných kyselin tak veliký, že není předpoklad jejich odbourání jablečno-mléčným kvašením (biologickou cestou), pak je vhodné přistoupit k jejich odbourání chemickou cestou. Chemickým odbouráním v moštu lze podpořit následné odbourávání jablečno-mléčným kvašením. Naopak ale pokud přistoupíme ke snížení kyselin v moštu, který neobsahuje extrémně vysoké veškeré titrovatelné kyseliny, riskujeme, že při nedostatečném sledování biologického odbourávání může být úbytek kyselin nadměrný a víno příliš fadní. Proto se jeví přijatelnější odkyselovat chemickou cestou až vína, která nedostatečně biologicky odbourala [25]. Odkyseluje se buď čistým vápencem, který váže kyselinu vinnou, nebo průtokem přes vrstvu anexu, popř. míšením kyselých moštů s méně kyselými (tzv. scelování). Okyselování se provádí v letech s nízkým obsahem kyselin v moštu. Přidává se kyselina vinná v množství 1 – 2 g/l tak, aby celková kyselost byla 7 – 8 g/l [21].

Úprava cukernatosti moštu se dělá v nepříznivých letech, kdy mošty obsahují málo cukru a příliš kyselin. Upravuje se přidavkem cukru, zahuštěným moštem [21].

2.3.4. Kvašení moštu

Ve vinařství se používají kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* s různými názvy podle místa původu, např. Malaga, Madeira, Champagne aj. Stále více se používají i ve formě ASVK – aktivovaných sušených vinařských kvasinek. Dříve se využívalo především spontánní kvašení způsobené kvasinkami ulpěnými na povrchu hroznů. Dnes se používá i čisté neboli řízené kvašení. Zákvas se připravuje v množství 1 % veškerého moštu namnožením vhodného kmene kvasinek v malém podílu sterilního moštu. Silně sířené mošty se zakvašují kvasinkami adaptovanými na oxid siřičitý [21]. Z biotechnologického hlediska můžeme kvašení rozdělit na etapu [24]:

1. rozmnožování kvasinek a začátku kvašení, která trvá 2 až 4 hodiny.

2. bouřlivého kvašení moštu tzv. exponenciální fázi růstu kvasinek. Bouřlivé kvašení trvá 7 až 14 dní, přičemž se tvoří velké množství oxidu uhličitého a tepelné energie, kterou se mošt zahřívá na 25 až 28 °C.
3. dokvašování, kdy je růst kvasinek zpomalený, kvasný proces v mošti se zpomaluje a zpomaluje se i vývoj oxidu uhličitého.

Fáze dokvašování nastává po poklesu obsahu cukru na 2 – 5 g/l a trvá 1 – 2 měsíce, někdy i půl roku. Po ukončení kvašení a zastavení vývinu oxidu uhličitého začnou kvasinky sedimentovat na dno tanku a usazují se i kaly. V období od ukončení kvašení do stáčení vína z kvasničných kalů probíhá formování vína. Probíhají při ní různé biologické a fyzikálně chemické procesy – biologické odbourání kyselin, zejména jablečno-mléčné kvašení a ostatní biochemické přeměny kyselin. Tyto biochemické procesy jsou doprovázeny vylučováním vinného kamene ve formě vinanu vápenatého a hydrogenvinanu draselného a procesy samočištění vína, při nichž se srážejí a sedimentují shluky molekul opačného náboje organického i anorganického charakteru (bílkoviny, polyfenoly, barevné látky, slizy, gumovité látky a kationy kovů i soli kyselin). Víno se pozvolna samovolně čistí [21, 23].

2.3.5. Jablečno-mléčné kvašení

Při dokvašení dochází k intenzivnímu odbourávání kyseliny jablečné. Jedná se o malolaktické, neboli jablečno-mléčné kvašení, a je velmi cenné zejména v ročnících s vysokým obsahem kyselin a v okrajových vinařských oblastech. Část kyseliny jablečné mohou odbourávat i kvasinky rodu *Schizosaccharomyces*, které ji přeměňují na ethanol v anaerobních podmínkách. Významnější jsou však bakterie mléčného kvašení, kterým se v závěru primárního kvašení zlepšují podmínky pro jejich činnost, když kvasinky odumírají a autolýzou uvolňují aminokyseliny, vitamín B₁ a další růstové látky. Na rozvoj bakterií dále příznivě působí zvýšení pH po krystalizaci vinného kamene [25].

Činnost BMK u našich vín brzdíme jen u vín s nízkým obsahem kyselin, jako je Müller Thurgau a u odrudových vín, které zvýšený obsah vznikající kyseliny mléčné senzoricky poškozuje jako je Tramín a Ryzlink rýnský. U jiných je naopak velmi prospěšné a projevuje se [25]:

- snížením celkové kyselosti, tj. snížením koncentrace vodíkových iontů.
- harmonií poměru kyselin a alkoholu, případně kyselin a zbytkového cukru.
- zvýšením stability vína po druhém stočení, takže není třeba se tolik obávat kvašení v láhvích.

V procesu jablečno-mléčného kvašení se nesnižuje extrakt, ale víno se stává jemnější, ztrácí ostrou kyselost kyseliny jablečné, která se přeměňuje na kyselinu mléčnou a oxid uhličitý (více viz kapitola 2.2.1). Činnost bakterií mléčného kvašení brzdí vysoký obsah alkoholu, při 12 – 15 obj. % se již úplně zastavuje. Dalším inhibitorem je oxid siřičitý i vázaný, oxid uhličitý a nízká teplota. Optimální teplota pro biologické odbourávání kyseliny jablečné je 18 – 25 °C, pod 10 °C se zcela zastavuje. Odbourávání kyselin dále podpoříme stykem vína s kvasnicemi a zejména jejich častým promícháním s vínem. Je na rozhodnutí vinaře, jeho zkušenosti a na senzorickém i chemickém posouzení, aby se rozhodl, zda

odbourávání kyselin podpoří nebo zastaví. Zastavit lze stočením vína z kvasnic, jeho silnějším zasířením a snížením teploty [25].

Dokvašené víno se odděluje od sedimentu kalů a kvasinek stáčením do čistých zasířených kvasných tanků. Při prvním stáčení se víno obvykle provzdušní a nastane další vysrážení kalů, především tříslobílkovinných. Proto se po 6 – 8 týdnech víno stáčí znovu. Víno po ukončení kvašení se nazývá mladé víno [21, 23].

2.3.6. Ošetřování a školení vína

Ošetřování a školení vína vytváří konečné senzorické vlastnosti a celkový charakter vína. Po kvašení se víno ukládá do zasířených ležáckých tanků nebo cisteren a ve starých závodech do dřevěných sudů. Ležácké nádoby se dolévají vínem, aby byly stále plné, a tím se zamezílo přístupu vzduchu a kontaminaci. Dolévá se vínem stejné odrůdy a třídy jakosti. Víno ležením v tancích zraje. Při stálé a nízké teplotě v ležáckém sklepě dochází k vytváření buketu a harmonickému vyrovnaní senzorických vlastností – vůně a chuť se zaokrouhlují. Doba zrání závisí na mnoha faktorech, jako je odrůda a ročník vína, teplota, přístup kyslíku, materiál a velikost tanků aj. Školení vína se provádí před plněním do lahví a zahrnuje čiření, stabilizaci, pasteraci a filtraci [21].

K čiření vína pokud neproběhne v dostatečné míře samovolně, se používá srážecích prostředků (želatina, kasein aj.), které se ve víně srážejí přítomnými nebo přidanými tříslovinami, dále hexakyano-železnatan draselný, který sráží těžké kovy za vzniku sraženiny berlínské modři, čímž se z vína strhávají i jemné koloidní látky (tzv. modré čiření) [21].

Ke stabilizaci vína se používají adsorpční prostředky (bentonitu, polyamidy, agar), na něž se koloidní složky vína adsorbují. Víno lze stabilizovat též chladem, neboť silné podchlazení vína pod 0 °C snižuje rozpustnost hydrogenvinanu draselného, který vypadává z vína ve formě krystalků [21].

Pasterace vína se provádí krátkodobým ohřevem na 60 – 70 °C v deskových průtokových výměnících tepla a následným rychlým ochlazením [21].

K filtraci vína se používají nejčastěji deskové nebo naplavovací křemelinové filtry, obdobně jako v pivovarství, a v moderních vinařských provozech se zavádí „cross-flow“ filtrace a membránové filtrace. Místo filtrů lze použít také vysokoobrátkové kalové odstředivky [21].

Po skončení školení, kdy víno je optimálně vyzrálé a je ukončen proces tvorby aróma a chuti vína, což většinou trvá nejdéle 1 rok, se víno plní do láhví. Hlavním požadavkem při plnění vína je, aby víno bylo dostatečně vyzrálé a vyškolené, aby nemělo sklon k tvorbě zákalů a nedocházelo u něho k dodatečným změnám organoleptických vlastností [23].

2.3.7. Integrovaná produkce hroznů a vína

Integrovaná produkce (IP) představuje způsob zemědělského hospodaření, jehož základním cílem je zajištění trvale udržitelného rozvoje ve smyslu § 6 zákona č. 17/1992 Sb. o životním prostředí, tedy rozvoje, který umožňuje zachovávat přirozené funkce

agroekosystému a ostatních ekosystémů, jež jsou zemědělskou produkcí přímo či nepřímo ovlivňovány [26].

Integrovaná produkce usiluje o dosažení optimálních výnosů vyšší kvality cestou, která nezatěžuje životní prostředí. Na bázi celistvého způsobu myšlení se IP orientuje komplexně na agroekosystém, je zaměřena na zemědělský podnik jako celek. Základem je udržení, resp. zlepšení půdní úrodnosti a mnohotvárného životního prostředí. Přednostně se využívají a podporují přirozené regulační mechanismy. K ochraně životního prostředí s ohledem na hospodárnost a společenské požadavky se vyžaduje smysluplný soulad mezi biologickými, technickými a chemickými opatřeními.

Veškeré technologické postupy, které registrovaní členové Svazu integrované produkce hroznů a vína používají ve svých vinicích musí odpovídat přesně stanoveným mezinárodním kritériím Svazu IP. Tyto kritéria jsou v České republice vydávána přibližně ve dvouletých cyklech pod názvem „Směrnice svazu integrované produkce hroznů a vína“ [26].

2.3.7.1. Regulace škůdců

Při ochraně révy před hlavními škůdci (obaleči, svilušky, hálčivec révový) v systému IP se předpokládá monitorování doby letu a množství obalečů feromonovými lapáky a monitorování populační hustoty škodlivých roztočů (v případě mikroskopické hálčivců velikosti toto hodnocení provádí specializované laboratoře).

Při ochraně jsou upřednostňovány biologické a biotechnické prostředky jako jsou draví roztoči, přípravky na bázi *B. thuringiensis*, a feromony používané metodou matení samců. Tyto způsoby ochrany jsou jednoznačně ekotoxikologicky vhodnější, než aplikace chemických, v přírodě cizorodých preparátů.

Provedení ochranného zásahu je podmíněno překročením prahu škodlivosti škůdcem [26].

2.3.7.2. Regulace chorob

Jak vyplývá z podstaty integrované produkce, je těžištěm ochrany révy proti chorobám prevence jejich škodlivých výskytů. Důležitá je optimalizace výživného stavu a fyziologické kondice révy a její důsledné provzdušňování. Výskytu virových chorob je třeba předcházet používáním certifikovaného, nejlépe bezvirového školkařského materiálu.

V systému ochrany před houbovými chorobami hraje velkou roli přesná prognóza kalamitních výskytů hlavních houbových chorob – plísně révy, padlí révy a šedé hniloby.

V současnosti jsou vyvinuty počítačové expertní systémy, které na základě přesného hodnocení srážek, teplot, ovlhčení listů a případně dalších faktorů vyhodnocují riziko kalamitního výskytu uvedených hlavních chorob i ve vztahu k jednotlivým odrudám a lokalitám. Tyto systémy však zůstávají, i když významnou, přeci jen pomůckou, takže v žádném případě nesnižují potřebu neustálé osobní kontroly zdravotního stavu vinic zkušeným vinohradníkem.

Směrnice IP stanoví maximální hranici šesti ošetření proti padlí révy a plísní révy, přičemž v měďnatých preparátech smí být použity pouze 2 kg mědi na hektar a rok. I v případě fungicidní ochrany se doporučuje udržování tzv. „okna do porostu“, to znamená části vinice,

kteřá není ošetřována. K zásahům je směrnici IP taxativně povoleno pouze použití vůči užitečnému hmyzu a roztočům méně toxických fungicidů a to jen v nezbytně nutné míře [26].

2.3.8. Ekologická produkce hroznů a vína

Obecně platí, že pěstování révy v režimu organického vinohradnictví je ve srovnání s integrovanou produkcí podstatně náročnější na úroveň vědomostí a zkušeností a podstatně náročnější na schopnost strategického uvažování. Organické vinohradnictví, pokud má jeho konečným produktem být tzv. biovíno z hroznů vypěstovaných tímto způsobem je také podstatně náročnější z hlediska organizačního.

Bioprodukce musí splňovat jednak Směrnici 2092/91 EU k Bio zemědělství a v České republice národní zákon 242/2000 Sb. a vyhlášku č. 53/2001 Sb. Dále musí biovinář přihlásit svou produkci ke kontrole některou z kontrolních organizací akreditovaných v ČR. Pokud by vinář měl v úmyslu vyvážet biovíno na některé náročné exportní trhy, jako je např. Velká Británie nebo USA, bude si navíc muset nechat svou produkci certifikovat některou pro biozemědělství akreditovanou kontrolní organizací v cílové zemi [26].

2.3.8.1. Regulace škůdců

Biovinář se zaměřuje na kvalitu půdy a vytváření podmínek, ve kterých se daří přirozeným antagonistům škůdců a plevelů. Rovnováha a samoregulační schopnosti půdy se podporují množstvím biotechnických pomůcek – pesticidy proti škůdcům jsou nahrazovány dravými roztoči, slunéčky, škvory či lumčíky, pásy zeleně mezi jednotlivými řadami vinohradu slouží jako útočiště užitečnému hmyzu a chrání půdu před vodní erozí. Časté jsou různé typy lapačů matoucích samečky obalečů, na vinohradech nechybí tradiční strašáky odhánějící ptačí lupiče a podobně. Povolnými postřiky jsou pouze přírodní sloučeniny mědi a síry pro potlačení plísní a padlí, vše ostatní probíhá na bázi jiných než chemických opatření. Plevel je likvidován mechanicky, rostlinné zbytky se zapracovávají do půdy a slouží jako přirozené hnojivo. Používání syntetických sloučenin (pesticidy, herbicidy, fungicidy atd.) je zcela zakázáno. Výsledkem je zelený vinohrad na živé půdě, s optimálním množstvím půdních mikroorganismů a minerálů [27].

2.3.8.2. Regulace chorob

Ve srovnání s integrovanou produkcí, kde je přípustné použití ekotoxikologicky akceptovatelných syntetických pesticidů a díky tomu je v naprosté většině případů možné reagovat na překročení prahu hospodářské škodlivosti chorob či škůdců aplikací některého pesticidu, je ochrana v organické produkci postavena především na prevenci. Jde jak o posilování vlastní obranyschopnosti pěstovaných keřů révy, především proti napadení hlavními houbovými chorobami a diverzifikaci ekosystému vinice, tak o stabilizaci celého agroekosystému vinice.

Obranyschopnost rostlin je dána jednak genomem pěstovaných kultivarů révy. Z tohoto hlediska jsou v organickém vinohradnictví preferovány jak odolnější kultivary evropské révy, tak interspecifické odrůdy.

Další možností zvyšování obranyschopnosti rostlin révy přináší aplikace moderních prostředků na bázi jemně mletých jílovitých zemin a rostlinných výluhů, po jejichž aplikaci dochází v buňkách zelených částí révy ke zvyšování hladiny fytoalexinů (např. resveratrolu), které zodpovídají na buněčné úrovni za odolnost vůči napadení rostlin patogeny.

Třetí možnost zvyšování přirozené odolnosti révy je dána přeměnou vinice z monokultury, a z ní plynoucího stresu, v druhově bohatý agroekosystém. Tímto způsobem je možno díky působení tisíců organismů osidlujících bohatý agroekosystém jak v půdě, tak mimo ni podstatně zvýšit stabilitu vinice jako celku. Příkladem zde můžou být mykorrhizní houby a mnohé další půdní mikroorganismy zlepšující biologickou, fyzikální a chemickou strukturu půdy.

Tyto organismy zmírňují stres ve výživě a příjmu vody rostlinami. Kultivací druhově vhodných směsí rostlin v meziřadí révy je možné systematicky dlouhodobě zvyšovat obsah organické hmoty a tím i humusu v půdě, což má na rostliny révy blahodárný vliv. Obecně platí, že organické vinohradnictví vyžaduje pečlivější provedení „zelených prací“. Ale i v tomto systému se dnes ověřují technologie s minimem ruční práce [26].

2.4. Důležité rody bakterií mléčného kvašení při výrobě vína

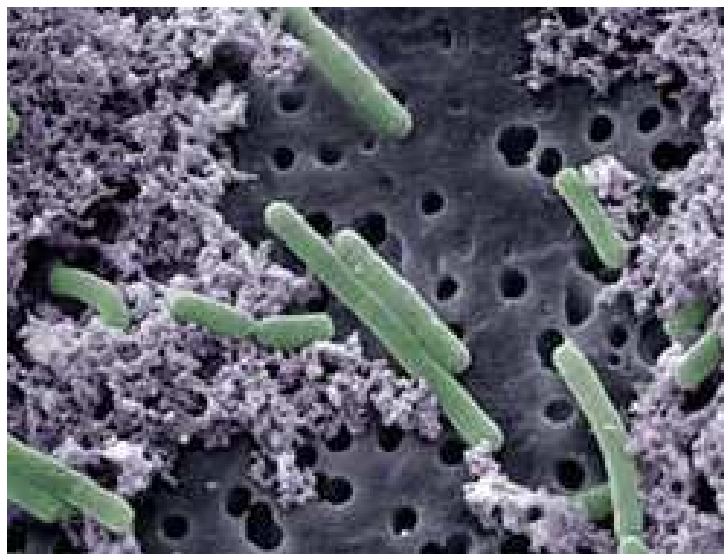
2.4.1. Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* představuje vysoce rozmanitou skupinu grampozitivních, mikroaerofilních bakterií, které se liší délkou tyčinek (Obr. č 6) nebo dokonce vytváří coccobacilly. Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou kataláza a cytochrom negativní, i když několik kmenů rozkládá peroxid pseudokatalázou. Tyto bakterie mléčného kvašení mají vysoké nutriční požadavky na aminokyseliny, deriváty nukleových kyselin, vitamíny, mastné kyseliny a zkvasitelné sacharidy. Pokud jde o hexóзовý metabolismus jsou druhy rodu *Lactobacillus* buď homofermentativní nebo heterofermentativní. Homofermentativní konvertují glukózu na DL-, D(-) nebo L(+) mléčnou kyselinu prostřednictvím Embden-Meyerhof-Parnasovy dráhy bez produkce CO₂, zatímco heterofermentativní metabolizují hexózy fosfoketolázovou dráhou za vzniku DL-, D(-) nebo L(+) mléčné kyseliny, CO₂ a etanolu nebo acetátu [17, 28].

Mezi druhy rodu *Lactobacillus* izolovaných z vína na celém světě patří *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. casei*, *Lb. cellobiosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum*, *Lb. fructivorans*, *Lb. hilgardii*, *Lb. homohiochii*, *Lb. jensenii*, *Lb. leichmannii*, *Lb. plantarum*, *Lb. sake* a *Lb. trichodes*. *Lb. cellobiosus* je považován za biotyp *Lb. fermentum*, zatímco *Lb. leichmannii* je nyní uváděn jako *Lb. delbrueckii* subs. *lactis*. *Lb. trichodes* je považován za synonymum *Lb. fructivorans* [5, 17].

Výskyt a přežití bakterií rodu *Lactobacillus* ve víně je velmi závislý na pH a obsahu etanolu. Při vysoké hodnotě pH vína (>3,5) často tyto bakterie převažují, zatímco při nižších hodnotách pH dominují jiné bakterie mléčného kvašení jako je *Oenococcus oeni*. Etanolvá tolerance se liší u jednotlivých druhů. Například růst *Lb. plantarum* se zastavuje při koncentraci etanolu 5 – 6 obj. %, zatímco více etanolově tolerantní *Lb. casei* a *Lb. brevis* byly úspěšně použity pro indukci malolaktického kvašení. *Lb. fructivorans* je vysoce

tolerantní vůči etanolu a byl izolován z dezertních vín s vysokým obsahem alkoholu (>20 % obj.) [17].



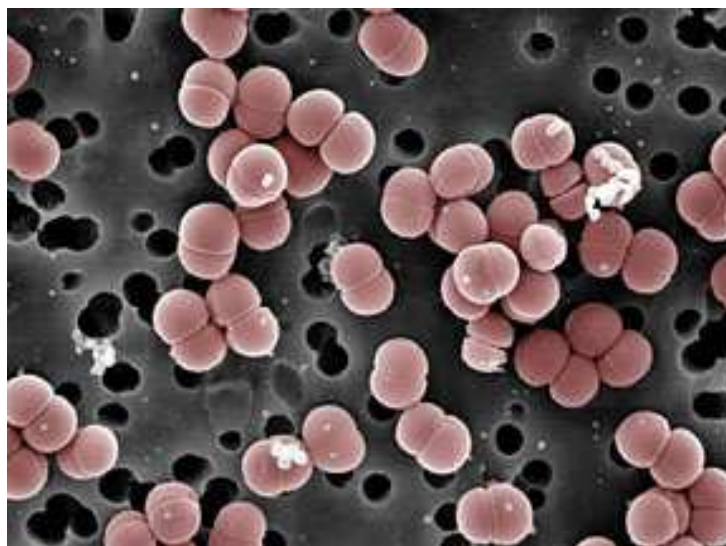
Obr. č. 6: Mikroskopický snímek buněk druhu *Lactobacillus casei* [29]

2.4.2. Rod *Pediococcus*

Bakterie rodu *Pediococcus* jsou charakterizovány jako kulovité (Obr. č. 7), nepohyblivé, kataláza negativní, aerobní až mikroaerofilní mikroorganismy. *Pediococcus* jsou jediné bakterie mléčného kvašení roztékající se ve dvou rovinách a tvořící tetrády nebo velké shluky buněk. Mezi současný seznam schválených druhů patří *P. acidilacti*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. halophilus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* a *P. urinae-equi*. Mezinárodní výbor pro systematickou bakteriologii rozhodl, že druh *P. cerevisiae* nebyl platně použit v publikacích, protože představuje alespoň dva druhy, *P. damnosus* a *P. pentosaceus* [17, 28].

Pediococcus jsou homofermentativní, tzn. že odbourávají glukózu prostřednictvím Embden-Meyerhof-Parnasovy dráhy na DL- nebo L-(+) mléčnou kyselinu bez produkce CO₂. Jsou chemoorganotrofní s velkými požadavky na růstové faktory a aminokyseliny. Všechny druhy vyžadují kyselinu nikotinovou, pantothenovou nebo biotin, ale žádný nevyžaduje thiamin, p-aminobenzoovou kyselinu nebo kobalamin. Rostoucí kultury mají také schopnost tvořit L-(+) mléčnou kyselinu z jablečné kyseliny [17].

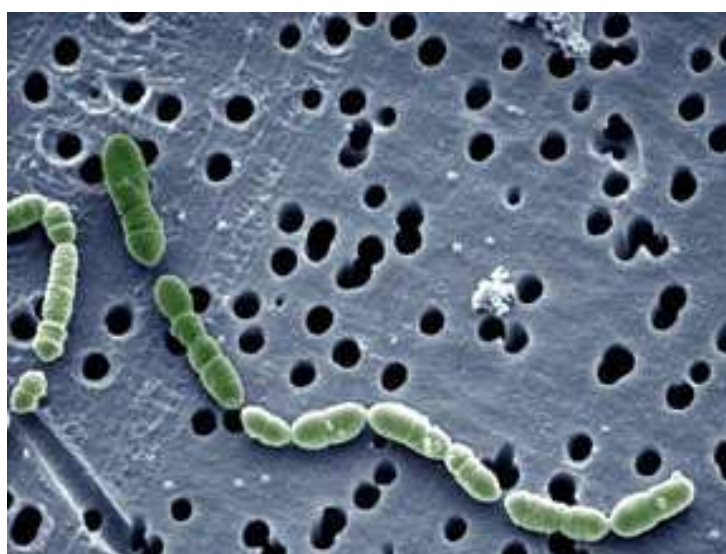
Bakterie rodu *Pediococcus* se dostávají do vína z půdy, hroznových bobulí nebo vinařského zařízení, ale jejich přežití ve víně je upřednostňováno při pH větším jak 3,5. Mezi druhy rodu *Pediococcus* izolovaných z vína patří *P. damnosus*, *P. inopinatus*, *P. pentosaceus* a *P. parvulus* [17].



Obr. č. 7: Mikroskopický snímek buněk druhu *Pediococcus pentosaceus* [29]

2.4.3. Rod *Oenococcus*

Kmeny vinných bakterií mléčného kvašení náležejících do rodu *Leuconostoc* byly původně Garviem [30] klasifikovány jako *Leuconostoc oenos*. Pozdější fylogenetické studie však odhalily, že *L. oenos* představuje odlišný druh od ostatních druhů *Leuconostoc* a vyústily v přeřazení tohoto mikroorganismu do nového rodu *Oenococcus*. Kmeny druhu *O. oeni* jsou grampozitivní, nepohyblivé, fakultativně anaerobní, elipsoidní až kulovité buňky (Obr. č. 8) obvykle se vyskytující v párech nebo řetízcích. *O. oeni*, je podobně jako *Lactobacillus*, chemoorganotrofní vyžadující bohaté médium s velkým množstvím růstových faktorů a aminokyselin. Tyto bakterie mléčného kvašení jsou heterofermentativní a tedy odbourávají glukózu na ekvimolární množství D-mléčné kyseliny, CO₂ a etanolu nebo kyseliny octové fosfoketolázovou dráhou [17, 28].



Obr. č. 8: Mikroskopický snímek buněk druhu *Oenococcus oeni* [29]

2.5. Mikrobiální interakce během výroby vína

Když se mošt dostane do tanku, obsahuje rozsáhlou řadu mikroorganismů, vláknité houby, kvasinky, mléčné a octové bakterie. Tyto mikroorganismy původně pocházejí z hroznů a zařízení, které se používají pro sklizeň a zpracování hroznů. Z této směsi jsou mikroorganismy zapojené do výroby vína přírodně selektovány – nejdříve velmi rychle a poté více progresivně (Obr. č. 9). Tento výběr se uskutečňuje v důsledku změn podmínek prostředí (složení, oxidační-redukční potenciál) a specifických antagonistických a synergických interakcí mezi různými mikroorganismy [31].

Kvasinky a bakterie neinteragují pouze s různými typy mikroorganismů (kvasinky a bakterie), ale také na úrovni druhu a kmene. Vzhledem k obrovské rozmanitosti mikroorganismů a jejich různé schopnosti adaptace na prostředí si lze představit celou řadu interakcí mezi nimi v závislosti na fázi výroby vína. Interakce kvasinky/bakterie během kvašení jsou patrně nejdůležitější [31].

2.5.1. Interakce mezi kvasinkami a bakteriemi mléčného kvašení

Kvasinky jsou dobře adaptovány na růst v hroznovém moštu. Od prvních dnů kvašení je jejich množení velmi rychlé. Stejně tak bakterie mléčného kvašení se množí ve stejném prostředí velmi snadno, ale když jsou v něm naočkovány samotné. V provozních podmínkách jsou však kvasinky a bakterie smíchány a kvasinky vždy dominují před bakteriemi. Jsou-li kvasinky a bakterie mléčného kvašení naočkovány v přibližně stejných koncentracích ($7 \cdot 10^5$ CFU/ml), jsou *Lactobacilli* zcela eliminovány po 8 dnech. *O. oeni* zaniká pomaleji a setrvává ve velmi nízké koncentraci. Pokud stejné mošty inokulujeme 10 až 100krát vyšší koncentrací bakterií, zůstávají životaschopné po delší dobu, ale nakonec lyzují, s výjimkou *O. oeni*. Tento druh se lépe adaptuje ve srovnání s ostatními [31].

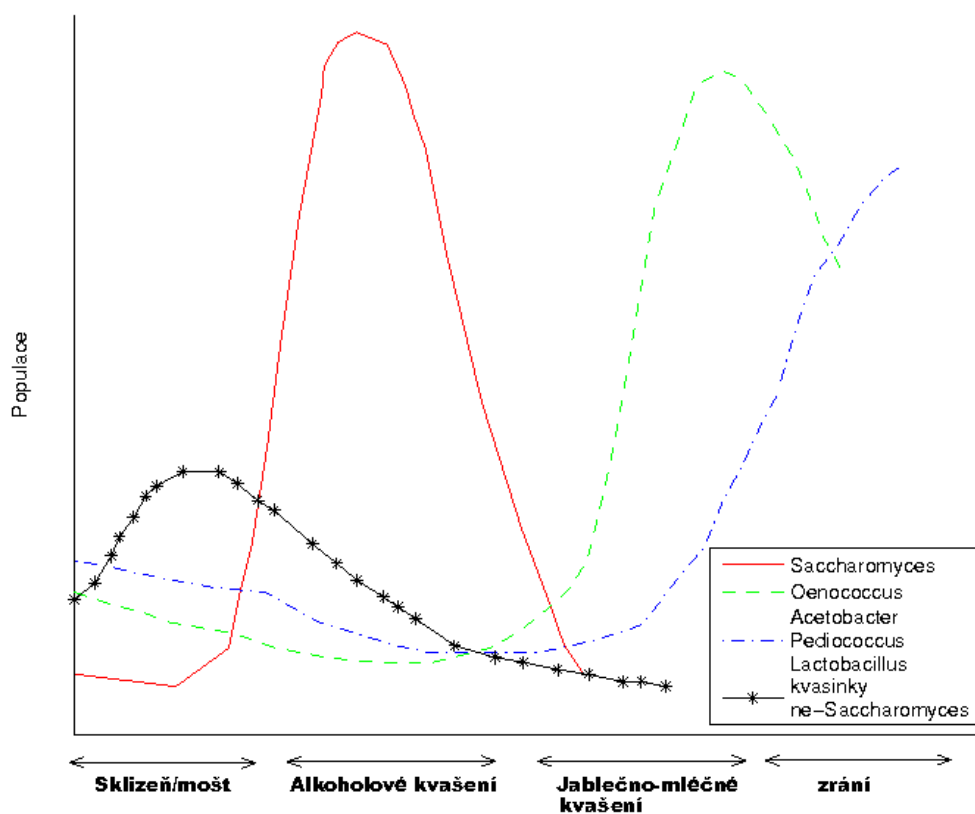
Proto jsou zkoumány podrobněji interakce mezi *S. cerevisiae* a *O. oeni*. Jestliže je hroznový mošt současně naočkován oběma mikroorganismy tak v počáteční fázi dochází v důsledku rapidního nárůstu kvasinek k poklesu bakteriální populace. Po této přechodné fázi nastává inverzní jev. Fáze odumírání kvasinek se shoduje s růstovou fází bakterií. Tento vývoj může být interpretován jako antagonismus kvasinek na populaci *O. oeni*. Bakterie se nejen nemohou množit, ale jsou také částečně eliminovány. Může to být také z části způsobeno nedostatkem nutričních látek. Mimoto bylo zjištěno, že během období zrychleného růstu na začátku kvašení, kvasinky ochuzují médium o aminokyseliny. Arginin může být zcela vyčerpán. Tyto jevy v kombinaci s toxickými účinky metabolitů, uvolněných kvasinkami, brání množení bakterií. Alkohol vznikající v prvních 3 – 4 dnech alkoholového kvašení nevysvětluje tento efekt. Naopak koncentrace etanolu 5 – 6 % obj. aktivuje bakteriální růst. Jsou zapojeny i další látky: mastné kyseliny uvolněné kvasinkami, jako je kapronová, kaprylová, kaprinová a zejména laurová kyselina. Tyto kyseliny modifikují bakteriální membránu. Inkubace celých buněk v přítomnosti těchto mastných kyselin vede k úniku ATP a ztrátě malolaktické aktivity [17, 31].

Během alkoholového kvašení narůstá koncentrace alkoholu v médiu. Negativní efekt metabolismu kvasinek je kompenzován několika pozitivními na konci fermentace. Když kvasinková populace vstupuje do stacionární fáze, situace není statická – ve skutečnosti životaschopná populace je tvořena buňkami, které se aktivně množí zatímco jiné lyzují.

Poslední zmíněné hrají důležitou roli pro bakterie – uvolňují vitamíny, dusíkaté báze, peptidy a aminokyseliny. Všechny tyto sloučeniny jsou růstové faktory bakterií. Z tohoto důvodu kvasinky v konečné fázi alkoholového kvašení stimulují růst bakterií. Tento efekt je také kombinován s méně známým jevem odpovídajícím inhibici kvasinek bakteriemi. Přesněji řečeno, bakterie urychlují fázi odumírání kvasinek. Glukosidázy a bakteriální proteázy jsou zodpovědné za hydrolýzu buněčné stěny kvasinek a vedou k lýzi celých buněk [31, 32, 33].

Na konci alkoholového kvašení tedy bakterie urychlují autolýzu kvasinek. Jejich růst je rovnoměrně stimulován uvolněnými produkty. Tyto jevy se umocňují navzájem a nakonec vedou k prudkému snížení činnosti a životaschopnosti kvasinek. Přispívají ke zpomalení či dokonce zastavení alkoholového kvašení. Nicméně bakterie pravděpodobně také produkují inhibitory kvasinek. Ve skutečnosti hroznový mošt předkultivovaný s bakteriemi je méně zkvasitelný kvasinkami než mošt s řízeným kvašením. Mezi testovanými druhy má nejvyšší výskyt *O. oeni*. Avšak je třeba zdůraznit roli *Lb. plantarum*, což je druh velmi běžný v moštech. Kmeny tohoto druhu inhibují nejen bakterie, ale také velkou část kvasinek z rodu *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* a *Schizosaccharomyces*. Inhibiční látkou je extracelulární protein, který je stabilní, ale může být inaktivován teplem [31, 3].

Podmínky prostředí, jako je pH a síření, hrají důležitou roli ve vývoji těchto směsných kultur. Zvýšení pH je příznivé pro množení bakterií. Naopak síření značně inhibuje bakteriální růst na počátku primárního kvašení. Jeho role je zásadní. Tato pozorování ukazují důležitost správného síření. Tím, že vezmeme v úvahu důležitost pH se lze vyhnout vinařským nehodám způsobeným soutěžením mezi kvasinkami a bakteriemi jako je mléčná nemoc nebo problémy s jablečno-mléčným kvašením [31].



Obr. č. 9: Populace vybraných mikroorganismů během výroby vína [17]

2.5.2. Interakce mezi bakteriemi mléčného kvašení

Pořadí bakteriálních druhů během alkoholového kvašení lze vysvětlit rozdíly v citlivosti k interakcím s kvasinkami. Současně však musí existovat interakce mezi bakteriemi mléčného kvašení. Bakterie jablečno-mléčného kvašení, stejně jako ostatní mikroorganismy, mohou syntetizovat a uvolňovat látky s antimikrobiální aktivitou. Tento problém byl podrobně prozkoumán v mléčném průmyslu, kde jsou následky vážnější. Bakteriociny jsou třídou proteinů, jejichž baktericidní aktivita má obecně omezený rozsah působení. Někdy je dokonce omezena na stejný druh jako je produkující kmen. Základní a aplikovaný výzkum bakteriocinů je na vzestupu a je známo široké spektrum těchto látek produkovaných mnoha druhy laktobacilů a koků. Lze si tedy představit, že každý kmen produkuje specifický bakteriocin. Klíčem k prokázání jejich existence je nalezení citlivých kmenů [17, 31].

U vinných bakterií mléčného kvašení tento problém řešili Rammelsberg a Radler (1990), Lonvaud-Funel a Joyeux (1993) a Strasser de Saad s kolektivem (1996). První z těchto prací oznámila objev dvou bakteriocinů: brevicin od *Lb. brevis* a caseicin produkovaný *Lb. casei*. První má široký rozsah působení a inhibuje kmeny *O. oeni* a *P. damnosus* kromě *Lb. brevis*. Caseicin je účinný pouze na *Lb. casei*. Brevicin je málo termostabilní protein (3 kDa), ale je stabilní v širokém rozmezí pH. Caseicin je méně stabilní, s mnohem vyšší molekulovou hmotností (40 – 42 kDa). Stejní autoři upozorovali, že *Lb. plantarum* má antimikrobiální aktivitu vůči mnoha bakteriálním druhům, jak proti laktobacilům tak kokům, zejména vůči *O. oeni*. Strasser de Saad a kolektiv dokázali u kmene *P. pentosaceus* produkci baktericidního proteinu, který působí na několik kmenů *Lb. hilgardii*, *P. pentosaceus* a *O. oeni*. Tento bakteriocin, produkovaný v hroznové šťávě ve velkém množství, je stabilní v kyselém prostředí a koncentraci etanolu typické pro vína [17, 31].

Stejně tak bylo testováno mnoho dalších kmenů náležejících mezi druhy bakterií izolovaných z vína aby byly potvrzeny možné reakce. Nejviditelnější účinky byly zaznamenány u *P. pentosaceus* a *Lb. plantarum*, oba silně inhibují růst *O. oeni* a *L. mesenteroides*. Tato inhibice neexistuje pouze ve smíšených kulturách, ale také když je do média předfermentovaného těmito dvěma druhy přidán *O. oeni*. Byly provedeny i různé pokusy za účelem charakterizace možných úloh peroxidu vodíku, pH a kyseliny mléčné. Pro dva druhy jsou inhibiční molekuly, akumulující se v kultivačním médiu, peptidy, které jsou termostabilní a jsou degradovány proteázami. Jejich toxický účinek je pouze dočasný, nepotlačují bakterie, jenom snižují rychlost růstu [31].

Kromě vlivu kvasinek a BMK mohou také ovlivnit vinné bakterie mléčného kvašení plísně a bakterie octového kvašení přítomné na zkažených hroznech. Média předkultivovaná těmito mikroorganismy mají různé dopady na množení BMK [31].

V médiu se akumulují organické kyseliny a polysacharidy a buď inhibují nebo aktivují bakteriální růst. V praxi mají jen malý účinek. Dokonce i když jsou hrozny zkažené zůstávají tyto metabolity v nedostatečné koncentraci aby mohly ovlivnit bakterie mléčného kvašení [31].

2.6. Identifikace bakterií ve víně pomocí polymerázové řetězové reakce

Většina bakteriálních druhů přítomných v průběhu výroby vína byla identifikována tradičními fenotypovými technikami založenými na morfologických, fyziologických

a biochemických testech. Nicméně použití fyziologických a biochemických kritérií pro identifikaci kmenů bakterií mléčného kvašení může přinášet nejasné výsledky, protože mnohé z těchto bakterií mají velmi podobné nutriční požadavky a růstové podmínky. Tyto tradiční fenotypové metody vyžadují 60 – 90 testů, proces je složitý a časově náročný. Fenotypové metody mají své omezení z důvodu relativně špatné reprodukovatelnosti a nízkého taxonomického rozlišení, které často umožňuje rozlišení pouze na úrovni rodu [1, 17].

V posledních dvou desetiletích jsme mohli být svědky vývoje velké série na studiu DNA založených identifikačních a detekčních metod. Bezpochyby jednou z hlavních výhod těchto metod je jejich nezávislost na změně růstových podmínek mikroorganismů. Genotypové techniky vykazují různý stupeň diskriminační síly, od druhového rozlišení po jednotlivé kmeny. Mnoho těchto molekulárních technik je založeno na principu polymerázové řetězové reakce (PCR), která umožňuje selektivní amplifikaci specifických fragmentů DNA pomocí oligonukleotidových primerů za kontrolovaných reakčních podmínek. Mezi modifikace polymerázové řetězové reakce patří např. nested-PCR, RAPD, RFLP, AFLP a rep-PCR [1].

2.6.1. Polymerázová řetězová reakce

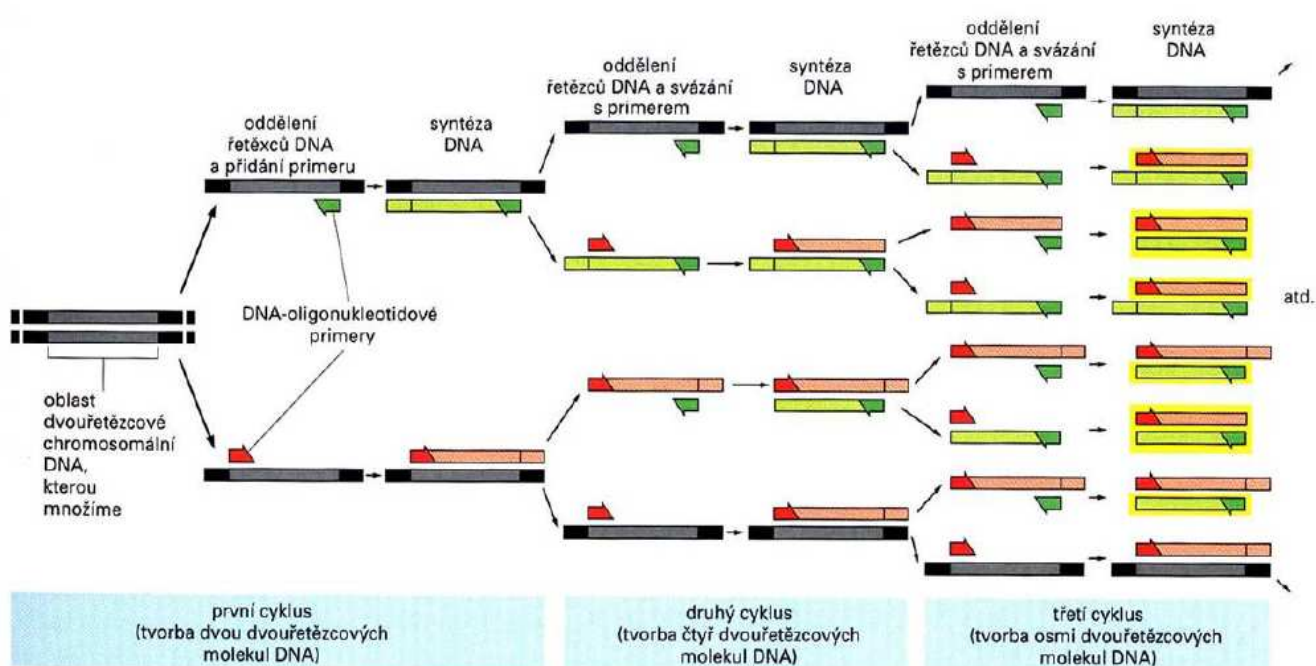
Polymerázová řetězová reakce je enzymová metoda sloužící k rychlé syntéze velkého množství definovaného úseku DNA *in vitro*. Tato metoda, podobně jako molekulové klonování, umožnila řadu experimentálních přístupů jež byly dříve neproveditelné a počet aplikací PCR neustále vzrůstá. PCR nachází uplatnění při syntéze fragmentů DNA nebo cDNA (DNA uměle získána reversní transkripcí mRNA) při detekci infekčních mikroorganismů a virů v potravinách, vodě a půdě, kontrole výrobků, mapování genomů, charakterizaci genů, prenatalní diagnostice dědičných chorob atd. [34]

Vzhledem k vysoké citlivosti detekce je možné PCR použít pro zjištění přítomnosti velmi malého množství nukleové kyseliny ve vzorku. Základem úspěšné reakce je použití neporušeného úseku DNA, který má být amplifikován (pomnožen). Velmi důležitým předpokladem pro úspěšnou reakci je navržení vhodných primerů tak, aby byla zajištěna specifita reakce. Jak návrh oligonukleotidových primerů tak programování reakčních kroků vychází z obecné znalosti struktury DNA a ze znalosti sekvence k níž jsou příslušné oligonukleotidy komplementární. Je tedy nutné zdůraznit, že pro PCR je nutno znát sekvence alespoň hraničních úseků fragmentu, který má být amplifikován [34].

2.6.1.1. Princip PCR

DNA, která má být reprodukována je zahřáta (denaturována) tak, aby došlo k oddělení dvou řetězců templátu. Poté jsou přidány dva primery, které jsou komplementární ke koncovým sekvencím oblasti jež má být amplifikována. Při ochlazení na vhodnou teplotu tyto primery nasednou na komplementární úseky templátu. Dále je přidána termostabilní DNA polymerasa a směs deoxynukleotidů (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), které slouží jako stavební kameny pro syntézu po dobu nutnou pro dokončení celého úseku [34].

Cyklus je opakován. Nově vzniklá vlákna slouží rovněž jako templáty pro syntézu dalších vláken. Řetězová reakce poskytuje exponenciální amplifikaci originální DNA, kde počet cyklů (n) určuje kolik kopií (2^n) je syntetizováno [34].



Obr. č. 10: Schéma polymerázové řetězové reakce [35]

2.6.1.2. Komponenty PCR

PCR pufr

Nejdůležitější složkou PCR pufru jsou ionty Mg^{2+} , které ovlivňují specifičnost i výtěžek PCR. Ionty hořčíku jsou potřebné na udržení enzymatické aktivity Taq DNA polymerasy, přičemž enzym vyžaduje dostupnost volných iontů. Ionty Mg^{2+} jsou vázané nukleotidy (Mg^{2+} tvoří s deoxyribonukleotidtrifosfáty rozpustné komplexy, což je důležité pro jejich zařazení do řetězce DNA), jako i jinými látkami (např. EDTA), takže při zvýšené koncentraci těchto látek v reakci je třeba zvýšit i koncentraci Mg^{2+} , aby DNA polymerasa zůstala funkční. Na druhé straně, příliš vysoká koncentrace iontů hořčíku může snížit přesnost DNA polymerasy. Vyšší koncentrace hořčíku také stabilizuje duplex DNA (zvyšuje teplotu tání), což může vést k neúplné denaturaci DNA v průběhu PCR a tím k nižšímu výtěžku reakce. Vyšší koncentrace hořčíku může stabilizovat i vazbu primerů k nespecifickým sekvencím, což může vést k tvorbě nespecifických produktů [36].

Kromě Mg^{2+} jsou důležitou složkou PCR pufru i jiné soli, které poskytují koncentraci iontů potřebnou na hybridizaci komplementárních sekvencí DNA. Nejčastěji se používá KCl, jehož finální koncentrace v PCR bývá obvykle 50 mM. V reakčních roztocích s KCl jsou však některé templáty bohaté na guaninové a cytozinové nukleotidy těžko amplifikovatelné, což je možné zlepšit použitím PCR pufru obsahujícího NaCl (v kterém se pravděpodobnělepší

denaturace). Vyšší koncentrace (nad 50 mM) KCl nebo NaCl působí na *Taq* DNA polymerasu inhibičně [36].

Na udržení potřebného pH se jako tlumivý roztok používá obvykle Tris-HCl s finální koncentrací v PCR 10 – 50 mM a pH 8,3. V průběhu PCR však může pH při vysokých teplotách klesnout i pod hodnotu 7, což může vést k poškození DNA templátu. Při vyšších teplotách (požívaných v PCR) a nižším pH může například dojít k fragmentaci DNA (depurinace nebo depyrimidinace), nebo k deaminaci cytosinu na uracil, což vede k zařazení nesprávného nukleotidu DNA polymerasou [36].

DNA templát

Kvalita templátové DNA výrazně ovlivňuje účinnost amplifikace. Vzorek DNA by tedy měl být dostatečně čistý, aby neobsahoval inhibitory PCR, přičemž má obsahovat přiměřené množství DNA. Někdy už i zmrazení vzorku ovlivňuje reprodukovatelnost PCR. Mezi potenciální inhibitory, které mohou být přítomné ve vzorku patří např. heparín, EDTA, $(\text{PO}_4)^{2-}$ anióny aj. [36]

Množství DNA templátu vloženého do PCR ovlivňuje specifitu a výtěžek reakce. Jestliže je templátu příliš málo, je malý výtěžek, když je templátu příliš hodně, může vznikat mnoho nespecifického produktu (v důsledku párování primerů na nespecifických sekvencích). Množství DNA vložené do reakce závisí na charakteru vzorku. Jestliže jde o plazmid, postačuje 0,01 – 0,1 ng, protože templát je lehce aplikovatelný (není přítomná jiná DNA). Když se jedná o komplexní templát, např. celkovou genomickou DNA, je potřebné vložit 100 – 1000 ng, aby bylo možné detekovat jednokopiový gen v nadbytku jiné DNA [36].

Primery

Ve většině reakcí je vhodná sekvence a koncentrace primerů parametrem rozhodujícím o úspěšném výsledku. Pro návrh vhodných primerů platí několik zásad. Je třeba však zdůraznit, že nejsou univerzální ale pouze orientační [34].

- zpravidla obsahují 18 - 24 nukleotidů
- neobsahují sekundární strukturu (nejsou v nich inversně opakované sekvence)
- nejsou vzájemně komplementární (netvoří vzájemně dimery)
- mají přijatelnou teplotu tání, která dovoluje jejich připojení k templátu (cca 55 °C – 65 °C) - vyšší teplota zpravidla představuje vyšší specifitu, oba primery by měly mít podobnou teplotu tání
- jejich optimální koncentrace v reakci je zpravidla 0,1 - 0,6 μM , vyšší koncentrace mohou vést ke vzniku nespecifických produktů
- na 5'-konec je možné přidat nekomplementární base (např. pro zavedení restrikčního místa)

Vzhledem k tomu, že se jedná o řetězovou reakci, tj. jedna molekula poskytuje dva úseky, následně vznikají 4 a pak 8 atd., lze opakováním třístupňových cyklů dosáhnout až 10^6 násobného pomnožení během 2 – 3 hodin [34].

Nukleotidy

Nukleotidy se do PCR přidávají ve formě deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP). Obvyklá koncentrace nukleotidů v PCR je 200 μM , při amplifikaci dlouhého produktu až 500 μM (přičemž je zároveň zvýšená i koncentrace Mg^{2+}). Taq DNA polymerasa katalyzuje polymerizaci nukleotidů s vyšší přesností, když je jejich koncentrace nižší. Koncentrace nukleotidů nad 200 μM vede ke zvýšení podílu molekul PCR produktu s chybně zařazenými nukleotidy. Zásobní roztoky nukleotidů se obvykle připravují v koncentraci 10 mM (při nižších koncentracích jsou nestabilní), přičemž by měly být neutralizované na pH 7 [36].

Termostabilní DNA polymeráza

Polymerázová řetězová reakce využívá termostabilní DNA polymerasu pro opakovanou syntézu obou vláken. Podmínka teplotní stability enzymu je dána tím, že jedním krokem opakovaných cyklů je denaturace DNA, tj. oddělení komplementárních vláken templátu za vysoké teploty (cca 95 °C). Pokud by byla DNA polymerasa při tomto kroku inaktivována (což je případ všech běžných enzymů), bylo by nutno je při každém cyklu po denaturaci přidat. V principu by byl tento postup možný, metoda by se však stala natolik nákladnou, že by byla nepoužitelná [34].

PCR voda

PCR voda se používá na doplnění PCR směsi o požadovaném objemu. Nejvhodnější je voda o odporu 18 M Ω nebo voda pro injekce dle ČSN [37].

2.6.2. Detekce PCR produktů

2.6.2.1. Elektroforéza v agarosovém gelu

K identifikaci, separaci a purifikaci fragmentů DNA získaných pomocí PCR se používá elektroforéza v agarosovém či polyakrylamidovém gelu. Fragmenty DNA jsou děleny v elektrickém poli v závislosti na jejich velikosti. Touto metodou může být detekován až 1 ng DNA. Rozdělené fragmenty DNA lze izolovat přímo z gelu a použít pro další práci. Volbou typu a koncentrace gelu lze zajistit vhodné podmínky pro dělení fragmentů v různých rozmezích molekulových hmotností. Pro posouzení velikosti jednotlivých fragmentů se používají markery molekulových hmotností, což jsou komerčně dostupné směsi fragmentů DNA definovaných velikostí [34].

DNA však není na agarosovém gelu možné vidět, je nutné ji obarvit nebo označit. Jednou z citlivých metod detekce je barvení DNA s látkou (např. ethidium bromid), která po navázání na DNA fluoreskuje v ultrafialovém světle [38].

3. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo monitorování a porovnání celkového počtu bakterií mléčného kvašení během výroby vína odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice a odrůdy Sauvignon z integrované a ekologické vinice. Dalším cílem byla jejich rodová a druhová identifikace.

Součástí práce bylo řešení následujících bodů:

- Stanovení počtu buněk výsevem na misky s diferenciacním médiem
- Izolace čistých kultur bakterií mléčného kvašení z kultur směsných
- Izolace a purifikace bakteriální DNA metodou fenolové extrakce
- Provedení rodově specifické PCR pro rod *Lactobacillus*
- Provedení druhově specifické PCR pro druh *O. oeni*, *Lb. casei/paracasei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* a *Lb. fermentum*

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál

4.1.1. Použité bakteriální kmeny a DNA

V experimentech byly použity bakteriální kultury pocházející z České sbírky mikroorganismů CCM – Czech Collection of Microorganisms (Masarykova univerzita, Brno, ČR):

- *Lactobacillus plantarum* CCM 4281
- *Lactobacillus fermentum* CCM 7192
- *Lactobacillus casei* CCM 4791
- *Oenococcus oeni* CCM 2834
- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCM 1753^T

DNA kmenů *Oenococcus oeni* CCM 2834 a *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCM 1753^T byla získána od Ing. Štěpánky Trachtové a Ing. Kateřiny Illkové. Dále byly v práci použity bakterie vyizolované z vinného moštu odrůdy bílého vína Sauvignon z ekologické a integrované vinice a odrůdy červeného vína Cabernet Moravia z ekologické vinice. Dodavatelem vzorků bylo vinařství Holánek, sídlící v obci Ivaň v mikulovské vinařské oblasti.

4.1.2. Chemikálie

Pro přípravu médií a roztoků byly použity následující chemikálie:

- Agar (Lachema, Brno, ČR)
- Agaróza pro elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Lachema, Brno, ČR)
- Ethanol (Lachema, Brno, ČR)
- Ethidium bromid (5 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol (pH 7,8) (Lachema, Brno, ČR)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Lachema, Brno, ČR)
- Izoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- MRS Broth (Oxoid, Londýn, Velká Británie)
- Tomato Juice Medium Base (HiMedia, Mumbai, Indie)
- Lactobacilli Supplement, Modified (HiMedia, Mumbai, Indie)

- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Proteináza K (Sigma, St. Louis, USA)
- RNáza A (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-base) (Amresco, Solon, USA)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan hydrochlorid (Tris-HCl) (Amresco, Solon, USA)

4.1.3. Kultivační média

- Tomato Juice Medium Base (určené pro Lactobacilli ve víně)

Médium bylo připraveno podle návodu od výrobce. V 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 40,0 g přípravku, konečné pH média bylo 5,0. Poté bylo médium sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. K 500 ml vysterilizovaného média byl přidán rehydratovaný Lactobacilli Supplement, Modified. Jedná se o antibiotikum určené k selektivní izolaci Lactobacillů z vína.

- MRS médium s přidavkem cysteinu (0,5 g/l)

V 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 52 g M.R.S. Broth (Oxoid), pH média bylo upraveno na hodnotu 6,5. Poté bylo médium sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Po zchlazení média bylo sterilně přidáno 10 ml cysteinu (zásobní roztok 5% byl 100× zředěn na výslednou koncentraci 0,05%).

- MRS agar s přidavkem cysteinu (0,5 g/l)

Do MRS média byl přidán agar v množství 15 g/l, pH média bylo upraveno na hodnotu 6,5. Poté bylo médium sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Po zchlazení média bylo sterilně přidáno 10 ml cysteinu (zásobní roztok 5% byl 100× zředěn na výslednou koncentraci 0,05%).

4.1.4. Roztoky

4.1.4.1. Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk a izolaci bakteriální DNA

- 0,5 M EDTA (pH 8,0)

186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody, pH bylo upraveno přidáním asi 20 g NaOH. Nejprve bylo přidáno 15 g NaOH a poté zbytek za stálé kontroly pH roztoku. EDTA bylo rozpouštěno při hodnotě pH 8 za stálého míchání na magnetické míchačce. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 1 l, rozdělen do alikvotních podílů a poté sterilizován v autoklávu (121 °C/20 min).

- 1 M Tris-HCl (pH 7,8)

121,1 g Tris-báze bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody, pH roztoku bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na hodnotu 7,8. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1 l, rozdělen do alikvotních podílů a poté sterilizován v autoklávu (121 °C/20 min).

- Lyzační roztok A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0)

Roztok byl připraven smícháním 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98 ml sterilní destilované vody. K přípravě byly použity sterilní zásobní roztoky.

- Lyzační roztok B (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0; lysozym 3 mg/ml)
K lyzačnímu roztoku A byl přidán lysozym na výslednou koncentraci 3,0 mg/ml.

- SDS (10 %, 20 %)
10 (20) g SDS bylo rozpuštěno v 90 (80) ml sterilní destilované vody při současném zahřívání na 68 °C, pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,0 koncentrovanou HCl. Poté byl roztok doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml a rozdělen do alikvotních podílů. Roztok není nutné sterilizovat.

- Proteinasa K (100 µg/ml)
100 µg proteinasy K bylo rozpuštěno v 1 ml sterilní destilované vody. Roztok byl uchováván při – 20 °C.

- CIZ
Směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1.

- 3 M octan sodný
40,81 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody, pH bylo upraveno ledovou kyselinou octovou na hodnotu 5,2. Roztok byl doplněn na výsledný objem 100 ml a poté sterilizován v autoklávu (121 °C/20 min). Roztok byl sterilně rozdělen do alikvotních podílů a uchováván při teplotě 4 °C.

- 1 × TE pufr
Sterilně byl smíchán 1 ml 1 M Tris (pH 7,8), 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98,8 ml destilované vody. Roztok se rozdělí do alikvotních podílů. Před použitím se 10× zředil sterilní destilovanou vodou na výslednou koncentraci 0,01 M Tris a 0,001 M EDTA.

- 1 M NaOH
40 g NaOH bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Roztok byl doplněn do 1 l a rozdělen do alikvotních podílů.

4.1.4.2. Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu

- DNA standard (100 bp)
Obsahuje fragmenty o délce: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp.

- 5 × TBE pufr
54 g Tris-báze a 27,5 g kyseliny borité bylo rozpuštěno v 600 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a roztok byl doplněn na objem menší než 1 l, pH bylo upraveno 1 M NaOH na hodnotu 8,0 a konečný objem byl doplněn na 1 l. Lze přefiltrovat a sterilizovat v autoklávu. Před použitím se TBE pufr 10× ředí destilovanou vodou.

- Agarosový gel
0,8%: 0,8 g agarosy se rozvaří ve 100 ml 0,5 × koncentrovaného TBE pufru

1,8%: 1,8 g agarosy se rozvaří ve 100 ml 0,5 × koncentrovaného TBE pufru

- Ethidium bromid (0,5 µg/ml)
- 100 µl roztoku EtBr o koncentraci 2,5 mg/ml se zředí 500 ml sterilní vody.

4.1.5. Komponenty pro PCR

- Voda pro PCR – voda pro injekce ČSL 4 (Biotika, Slovenská Lupča, SR)
- Reakční pufr kompletní pro *Taq* DNA polymerasu 1.1 (10 × koncentrovaný) (Top-Bio, Praha, ČR)
- dNTP směs (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Oligonukleotidové primery (100 pmol/µl) (Bitech, Hradec Králové, ČR)
- *Taq* polymerasa 1.1 (1U/µl) (Top-Bio, Praha, ČR)
- MgCl₂ (25 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- DNA matrice

4.1.6. Přístroje a pomůcky

- Centrifuga (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)
- Centrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Sterilní box Aura mini (Bioair, Itálie)
- Trinokulární mikroskop INTRACO MICRO SM – 5 (Merci, Brno, ČR)
- Fotoaparát Polaroid CD 34 na film T667 (Cambridge, Velká Británie)
- Laboratorní váhy (Kern & Sohn, Německo)
- Mikropipety Discovery HTL o objemu 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Discovery HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 5020 (Sencor, ČR)
- Minicentrifuga C1301 (Labnet international, Inc., USA)
- Cycler RG 6000 (Corbett Research, Austrálie)
- NanoPhotometr (Implen, Německo)
- Termostat – Mini incubator (Labnet, USA)
- Transluminátor TVR 3121 (Spectroline, Paramount, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Easy-Cast, model B1 (Owl Scientific, USA)
- Zdroj elektrického napětí Lighting volt Power Supply, model OSP-300 (Owl Scientific, USA)
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

4.2. Metody

Není-li uvedeno jinak, byly jednotlivé postupy provedeny podle skript Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie [37].

4.2.1. Stanovení počtu buněk bakterií mléčného kvašení u odrůd vína

Na stanovení počtu životaschopných buněk byla použita plotnová metoda patřící mezi nepřímé metody počítání buněk. Tato metoda je založená na zjištění počtu kolonií vyrostlých na ztužených půdách za předpokladu, že každá kolonie vznikla z jedné buňky [39].

K tomu, aby bylo dosaženo požadovaného počtu kolonií na Petriho misce (30 – 300) byl vzorek naředěn postupným desítkovým způsobem. Nejdříve byla připravena řada sterilních zkumavek s 0,9 ml sterilní vody a předsušené agarové plotny. Poté bylo přeneseno sterilní pipetou 0,1 ml vzorku do první zkumavky s 0,9 ml sterilní vody a obsah byl důkladně promíchán. Další sterilní pipetou bylo přeneseno 0,05 ml tohoto ředění na povrch první agarové desky a 0,1 ml do další zkumavky s 0,9 ml sterilní vody. Vzniklý obsah byl promíchán a novou sterilní pipetou bylo přeneseno 0,05 ml druhého ředění na povrch druhé agarové desky a 0,1 ml do další zkumavky. Takto byl zkoumaný vzorek ředěn až do potřebného konečného zředění. Během práce byly dodržovány přísně aseptické podmínky.

Vzorek na agarových deskách byl rozetřen sterilní skleněnou tyčinkou zahnutou do tvaru hokejky přímočarým i krouživým pohybem až do úplného vsáknutí kapaliny. Poté byly Petriho misky uloženy v termostatu dnem vzhůru a byly inkubovány při teplotě 37 °C. Počet vyrostlých kolonií byl zjišťován po 24 – 72 hodinách kultivace. Z výsledku dvou paralelních misek ze zředění poskytující vyhovující počet kolonií (tj. 30 – 300 na jedné Petriho misce) byl vypočítán aritmetický průměr, který byl poté přepočten na 1 ml původního vzorku.

4.2.2. Izolace bakterií mléčného kvašení křížovým roztěrem na plotnu a čištěním pomocí jedné kolonie

Izolace křížovým roztěrem byla použita pro získání čistých kultur bakterií mléčného kvašení z kultur směsných, které byly získány kultivací v termostatu na předsušených agarových plotnách při 37 °C po dobu 24 – 72 hodin. Směsná kultura bakterií byla nejdříve vhodně naředěna. Ve sterilním boxu byly nachystány 3 zkumavky – do prvních dvou bylo napipetováno 10 ml sterilní vody a do poslední zkumavky pouze 9 ml. Pomocí bakteriologické kličky byly z Petriho misky se směsnou kulturou odebrána dvě očka a přenesena do první zkumavky obsahující 10 ml sterilní vody. Obsah zkumavky byl důkladně promíchán na vortexu. Po promíchání bylo z první zkumavky pomocí mikropipety odebráno 50 µl suspenze do druhé zkumavky s 10 ml sterilní vody, následovalo promíchání na vortexu. Poté byl z druhé zkumavky odebrán 1 ml vzniklé suspenze do třetí zkumavky s 9 ml sterilní vody. Po promíchání bylo z poslední zkumavky mikropipetou přeneseno 50 µl suspenze na Petriho misku, obsahující tuhou agarovou půdu, a pomocí bakteriologické kličky rozetřeno křížovým roztěrem. Takto připravené Petriho misky byly uloženy v termostatu dnem vzhůru a inkubovány při 37 °C po dobu 24 – 72 hodin. Po kultivaci byly jednotlivé kolonie přeočkovány na novou Petriho misku tak, že byly rozetřeny po celé ploše a opět vloženy do termostatu a inkubovány 24 – 48 hodin při 37 °C.

Celý postup byl opakován několikrát až do té doby než byly získány čisté kultury bakterií mléčného kvašení za současné kontroly pomocí mikroskopu. Takto získané čisté kultury byly přeočkovány do tekutého MRS média s přísadkou cysteinu a uchovávány při -80 °C v 15% glycerolu.

4.2.3. Izolace DNA

4.2.3.1. Lyze buněk

1. Kultura buněk (1 ml) narostlá v tekutém živném médiu MRS byla přenesena do Eppendorfovy zkumavky. Připravená suspenze byla centrifugována při 15 000 otáčkách po dobu 3 minut. Supernatant byl opatrně slit a sediment nechán okapat.
2. Sediment bakteriálních buněk byl poté resuspendován v 1 ml lyzačního roztoku A, získaná suspenze byla opět centrifugována při 15 000 otáčkách po dobu 3 minut, supernatant byl opatrně slit a sediment nechán okapat.
3. K sedimentu bylo přidáno 500 µl lyzačního roztoku B a byl důkladně resuspendován. Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny za občasného promíchání.
4. K suspenzi bylo přidáno 25 µl 10% SDS a 5 µl proteinasy K (100 µg/ml) a vše bylo důkladně promícháno. Vzorky byly inkubovány při 55 °C do druhého dne (5 – 15 hodin).
5. Poté bylo ke vzorkům přidáno 10 µl RNásy A (100 µg/ml) a po promíchání byly inkubovány při 37 °C po dobu 30 minut.

Takto lyzované buňky jsou označovány jako hrubý lyzát bakteriálních buněk. Z hrubého lyzátu se izoluje DNA.

4.2.3.2. Fenolová extrakce

1. K 500 µl hrubého lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu (pH 7,8) a směs byla kývavým pohybem opatrně promíchávána po dobu 4 minut.
2. Směs byla centrifugována při 15 000 ot./3 minuty.
3. Pomocí špičky s ustřiženým hrotem byla následně odebrána vodní fáze s DNA do čisté Eppendorfovy zkumavky.
4. K takto odebrané vodní fázi s DNA bylo přidáno 700 µl CIZ a směs byla opatrně promíchávána kývavým pohybem 4 minuty.
5. Centrifugace při 15 000 ot./3 minuty.
6. Vodní fáze s DNA byla opět odebrána do čisté Eppendorfovy zkumavky.

4.2.3.3. Přesrážení DNA ethanolem

1. Ke vzorku DNA byla přidána 1/20 objemu 3 M octanu sodného a vzorek byl promíchán.
2. Byl přidán 1 ml (2,5 násobek objemu) 96% ethanolu, směs byla důkladně promíchána.
3. DNA se nechala vysrážet při -20 °C po dobu 15 minut.

4. Směs byla centrifugována při 15 000 ot./15 minut. Poté byl opatrně slit supernatant.
5. Sediment obsahující DNA byl sušen v exsikátoru (cca 15 minut).
6. Na závěr byla DNA rozpuštěna v 200 μ l TE pufru.

Takto izolovaná DNA byla použita pro spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA, agarosovou gelovou elektroforézu a jako matrice pro rodově a druhově specifickou PCR.

4.2.4. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistota izolované DNA byla měřena spektrofotometricky na NanoPhotometru pomocí speciálních Label Gard kyvet. Měření probíhalo při laboratorní teplotě. Vzorky DNA vytemperované na laboratorní teplotu byly před vlastním měřením důkladně promíchány. Jako referenční vzorek byl použit TE pufr. Byla měřena absorbance vlnových délek 230, 260, 280 a 320 nm. Koncentrace DNA byla stanovena z hodnoty absorbance A_{260} a to na základě poznatku, že DNA o koncentraci 50 ng/ μ l má při vlnové délce 260 nm absorbanci rovnou 1.

Čistota DNA byla stanovena z poměru hodnot A_{260}/A_{280} , poměr absorbancí čisté DNA se pohybuje v rozmezí 1,8 – 2,0. Jestliže vzorek obsahuje proteiny, je poměr menší než 1,8, jestliže vzorek obsahuje RNA, je poměr absorbancí větší než 2,0.

4.2.5. Agarosová gelová elektroforéza

Agarosová gelová elektroforéza s 0,8 % gelem byla používána k ověření přítomnosti a intaktnosti izolované chromosomální bakteriální DNA.

4.2.5.1. Příprava agarosového gelu

1. Na přípravu 0,8% agarosového gelu bylo 0,8 g agarosu rozpuštěno ve 100 ml $0,5 \times$ koncentrovaného TBE pufru.
2. Vzniklá suspenze byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě za opakovaného míchání.
3. Poté byl roztok nalit do vaničky s hřebínkem položené na vodorovné ploše.
4. Gel byl ponechán zatuhnout při laboratorní teplotě (přibližně 30 minut).
5. Před nanášením vzorků na gel byl hřebínek opatrně vyjmut.

4.2.5.2. Nanášení vzorků na gel, provedení gelové elektroforézy a barvení

1. Před nanesením do komůrky gelu bylo smícháno na podložce (proužek polyethylenu) 10 μ l DNA s 5 μ l TE pufru (nebo sterilní vody) a 3 μ l nanášecího pufru.
2. Takto vzniklá směs byla nanesena do komůrky gelu (ve směru zprava doleva).

3. Gel byl vložen do elektroforetické vany, převrstven $0,5 \times$ koncentrovaným TBE pufrem do výšky 2 – 3 mm nad gel a připojen k stejnosměrnému proudu tak, aby záporně nabitá DNA migrovala k anodě.
4. Elektroforéza byla spuštěna zapnutím zdroje nastaveného na 80 V. Separace probíhala obvykle cca 60 minut (do 2/3 gelu).
5. Po skončení elektroforézy byl gel obarven ethidium bromidem ($0,5 \mu\text{g/ml}$) po dobu 30 minut.

Obarvený gel byl poté opláchnut v destilované vodě a prohlížen na transluminátoru v UV světle (305 nm). Fotografická dokumentace gelu byla provedena digitálním fotoaparátem nebo Polaroid kamerou na film Polaroid 667.

4.2.6. Polymerázová řetězová reakce

Všechny komponenty PCR reakce byly před použitím vždy zkontrolovány, opatrně promíchány a krátce centrifugovány. PCR směs byla míchána v boxu vysterilizovaném UV zářením a to buď pro jednotlivé vzorky zvlášť do 200 μl eppendorfových zkumavek (při optimalizaci PCR) nebo byl připraven master mix. Master mix byl připraven smícháním jednotlivých reakčních komponent vynásobených počtem vzorků. 1 μl DNA matrice (pokud není uvedeno jinak) byl přidán jednotlivě ke 24 μl příslušné master mix směsi jako poslední. Výsledný objem PCR směsi byl vždy 25 μl .

Programy amplifikace používané v této práci jsou uvedeny v tabulkách u podkapitol věnovaných PCR. Jednotlivé řádky znamenají následující kroky:

1. Denaturace DNA před prvním cyklem
2. Denaturace DNA
3. Hybridizace primerů
4. Syntéza řetězců DNA
5. Počet cyklů (opakování kroků 2 až 4)
6. Dosyntetizování řetězců v posledním kroku

4.2.6.1. PCR pro doménu *Bacteria*

Amplifikace PCR produktů byla uskutečněna pomocí primerů F eub a R eub specifických pro doménu *Bacteria*, sekvence primerů je uvedena v Tabulce č. 1. Amplifikoval se specifický PCR produkt o velikosti 466 bp. Množství jednotlivých komponent PCR směsi je uvedeno v Tabulce č. 2, použitý program v Tabulce č. 3.

Tabulka č. 1: Specifické primery pro doménu Bacteria

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost PCR produktu (bp)	Zdroj
F eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466	[40]
R eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		

Tabulka č. 2: Složení PCR směsi pro doménu Bacteria (25 µl)

Komponenta PCR	Objem (µl)
PCR voda	19,5
10 × reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP (10 mM)	0,5
primer F eub (10 pmol/µl)	0,5
primer R eub (10 pmol/µl)	0,5
Taq DNA polymerasa (1U/µl)	0,5
DNA matrice	1,0

Tabulka č. 3: Program použitý při PCR pro doménu Bacteria

Krok	Doména Bacteria
1.	94 °C/5 min
2.	94 °C/30 s
3.	58 °C/30 s
4.	72 °C/1 min
5.	28
6.	72 °C/5 min

4.2.6.2. Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus* s purifikovanou DNA matricí

Rodově specifická PCR byla uskutečněna pomocí primerů LbLMA 1-rev a R16-1 specifických pro rod *Lactobacillus*, sekvence primerů je uvedena v Tabulce č. 4. Byl amplifikován specifický PCR produkt o velikosti 250 bp. PCR směs byla připravena dle Tabulky č. 5, amplifikační program je uveden v Tabulce č. 6.

Tabulka č. 4: Specifické primery pro rod *Lactobacillus*

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost PCR produktu (bp)	Zdroj
LbLMA 1-rev	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250	[41]
R16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA		

Tabulka č. 5: Složení PCR směsi pro rod *Lactobacillus* (25 µl)

Komponenta PCR	Objem (µl)
PCR voda	19,0
10 × reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP (10 mM)	0,5
primer LbLMA 1-rev (10 pmol/µl)	0,5
primer R16-1 (10 pmol/µl)	0,5
<i>Taq</i> DNA polymerasa (1U/µl)	1,0
DNA matrice	1,0

Tabulka č. 6: Program použitý při PCR pro rod *Lactobacillus*

Krok	Rod <i>Lactobacillus</i>
1.	95 °C/5 min
2.	95 °C/30 s
3.	55 °C/30 s
4.	72 °C/1 min
5.	30
6.	72 °C/10 min

4.2.6.3. Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus* z jedné bakteriální kolonie

Pro rodově specifickou PCR pro rod *Lactobacillus* z jedné bakteriální kolonie byla do PCR směsi místo templátové DNA přidána DNA uvolněná lyzí buněk z jedné bakteriální kolonie. Kolonie byla resuspendována ve 100 µl vody pro PCR a 10 minut povařena. Pro PCR byly použity shodné primery, složení PCR směsi a amplifikační program jako pro PCR pro rod *Lactobacillus* s DNA matricí (viz 4.2.6.3., Tabulka č. 4, 5 a 6).

4.2.6.4. Druhově specifické PCR

V práci byly provedeny druhově specifické PCR pro druhy *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus fermentum*. Primery použité pro druhově specifické PCR jsou uvedeny v Tabulce č. 7, složení PCR směsí v Tabulce č. 8 a použité programy v Tabulce č. 9.

Tabulka č. 7: Druhově specifické primery

Druh	Velikost PCR produktu (bp)	Zdroj
Označení primerů	Sekvence primeru (5'-3')	
<i>O. oeni</i>	1025	[42]
On1	TAA TGT GGT TCT TGA GGA GAA AAT	
On2	ATC ATC GTC AAA CAA GAG GCC TT	
<i>Lb. paracasei</i>	290	[43]
Y2	CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT	
paracasei	CAC CGA GAT TCA ACA TGG	
<i>Lb. plantarum</i>	318	[44]
planF	CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA	
pREV	TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC	
<i>Lb. fermentum</i>	900	[45]
FERM1	GTT GTT CGC ATG AAC AAC GCT TAA	
LOWLAC	CGA CGA CCA TGA ACC ACC TGT	
<i>Lb. casei/paracasei</i>	200 a 400	[46]
Pr I	CAG ACT GAA AGT CTG ACG G	
Cas II	GCG ATG CGA ATT TCT TTT TC	

Tabulka č. 8: Složení PCR směsí (25 µl)

Komponenta PCR	Označení primerů				
	On 1 On 2	Y2 paracasei	planF pREV	FERM1 LOWLAC	Pr I Cas II
PCR voda	11,5	15,5	19,5	19,5	15,5
10 × reakční pufr kompletní	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
směs dNTP (10 mM)	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0
MgCl ₂ (25 mM)	4,0	3,0	–	–	2,0
primery (10 pmol/µl)	1,0	0,5	0,5	0,5	1,0
<i>Taq</i> DNA polymerasa (1U/µl)	2,0	1,0	0,5	0,5	1,0
DNA matrice	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Tabulka č. 9: Programy použité pro druhově specifické PCR

Krok	Druh				
	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Lactobacillus. paracasei</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>
1.	95 °C/5 min	94 °C/5 min	94 °C/3 min	95 °C/10 min	94 °C/5 min
2.	95 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s	95 °C/30 s	94 °C/30 s
3.	55 °C/30 s	58 °C/30 s	56 °C/10 s	50 °C/30 s	55 °C/30 s
4.	72 °C/2 min	72 °C/1 min	72 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/1 min
5.	35	30	30	35	30
6.	72 °C/10 min	72 °C/5 min	72 °C/5 min	72 °C/10 min	72 °C/5 min

4.2.6.5. Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů

Pro detekci PCR produktů byl použit 1,8 % agarosový gel, byl připraven stejným postupem jako gel v kapitole 3.2.5.1.

Na gel bylo nanášeno 15 µl PCR produktu, který byl předtím smíchán s 5 µl stop pufru. Vedle PCR produktů bylo na gel do zvláštní jamky nanášeno 5 µl standardu Malamité (100 bp žebříček) sloužícího k přesnému určení velikosti amplifikovaného produktu.

Další postup byl shodný jako v kapitole 3.2.5.2.

5. VÝSLEDKY

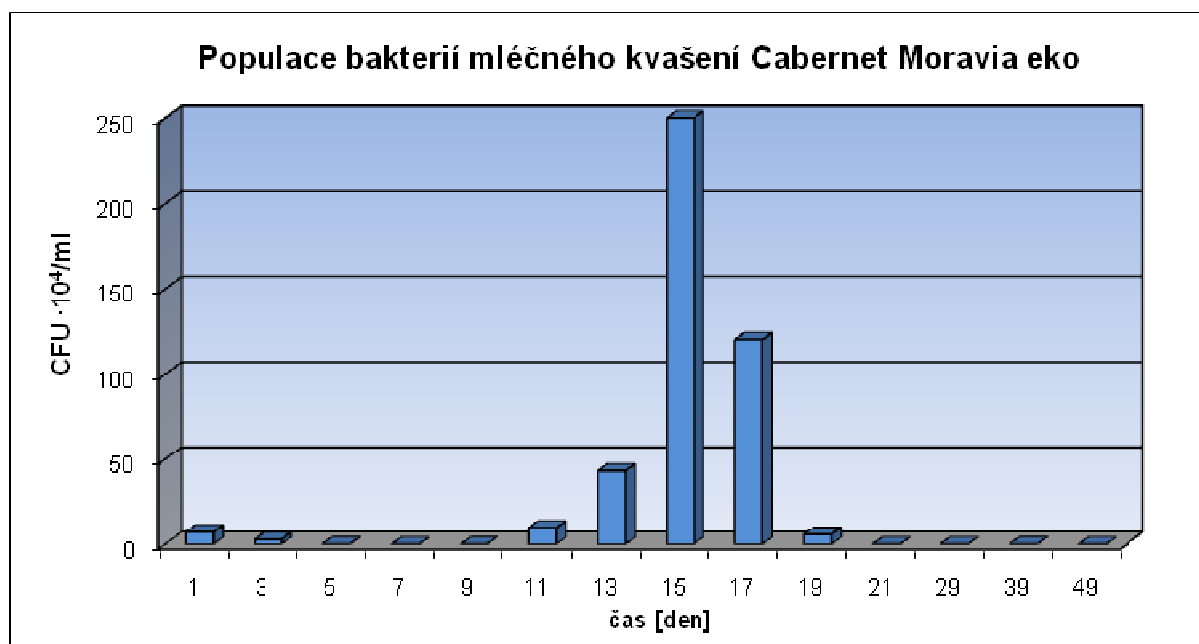
5.1. Sledování počtu bakterií mléčného kvašení ve vzorcích hroznového moštu během alkoholového kvašení u jednotlivých odrůd

Vzorky hroznového moštu, odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice a odrůdy Sauvignon z integrované a ekologické vinice, byly odebrány během alkoholového kvašení ve zvolených časových intervalech (tj. do 21. dne po dvou dnech, po 21. dni po 10 dnech) a monitorovány z pohledu celkového počtu bakterií mléčného kvašení, především bakterií rodu *Lactobacillus*. BMK byly sledovány na Tomato Juice Medium Base, který je svým složením a pH vhodný pro izolaci a identifikaci bakterií rodu *Lactobacillus*.

Při výrobě vína všech odrůd nebyly použity žádné startovací komerční kultury takže jak alkoholové, tak i malolaktické kvašení probíhalo spontánně.

5.1.1. Celkový počet bakterií mléčného kvašení během výroby červeného vína odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice

Celkový počet bakterií mléčného kvašení byl sledován od prvního po devětačtyřicátý den výroby červeného vína odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice a to ve zvolených časových intervalech (Graf č. 1).



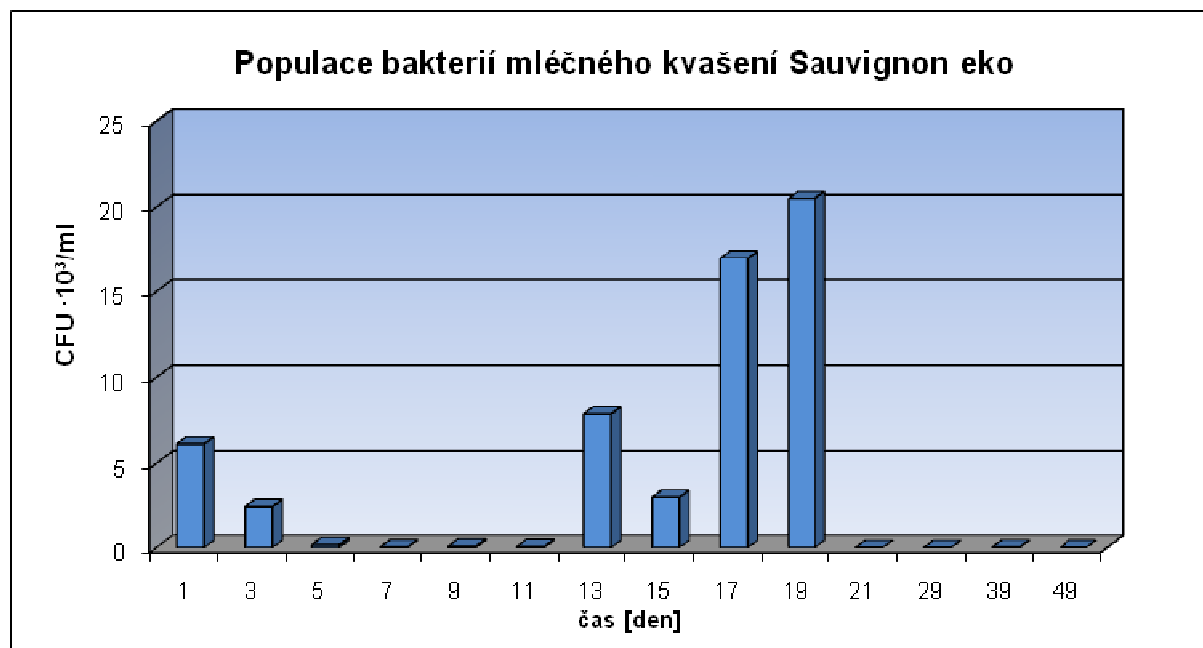
Graf č. 1: Počty bakterií mléčného kvašení v hroznovém moštu během výroby červeného vína odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice

=> Z grafu č. 1 je patrné, že se počet bakterií mléčného kvašení v hroznovém moštu na začátku kvašení snižoval. První den byl počet BMK $(7,25 \pm 0,50) \cdot 10^4$ CFU/ml, přičemž pátý den již nebylo získáno počitatelné množství. K výraznějšímu zvýšení celkového počtu

baterií mléčného kvašení došlo jedenáctý den. Od jedenáctého po devatenáctý den se populace BMK pohybovala v rozmezí $(5,88 \pm 0,06) \cdot 10^4$ až $(2,50 \pm 0,25) \cdot 10^6$ CFU/ml.

5.1.2. Celkový počet bakterií mléčného kvašení během výroby bílého vína u odrůdy Sauvignon z ekologické vinice

Výskyt bakterií mléčného kvašení byl sledován od prvního po devětačtyřicátý den výroby bílého vína odrůdy Sauvignon z ekologické vinice (Graf č. 2).

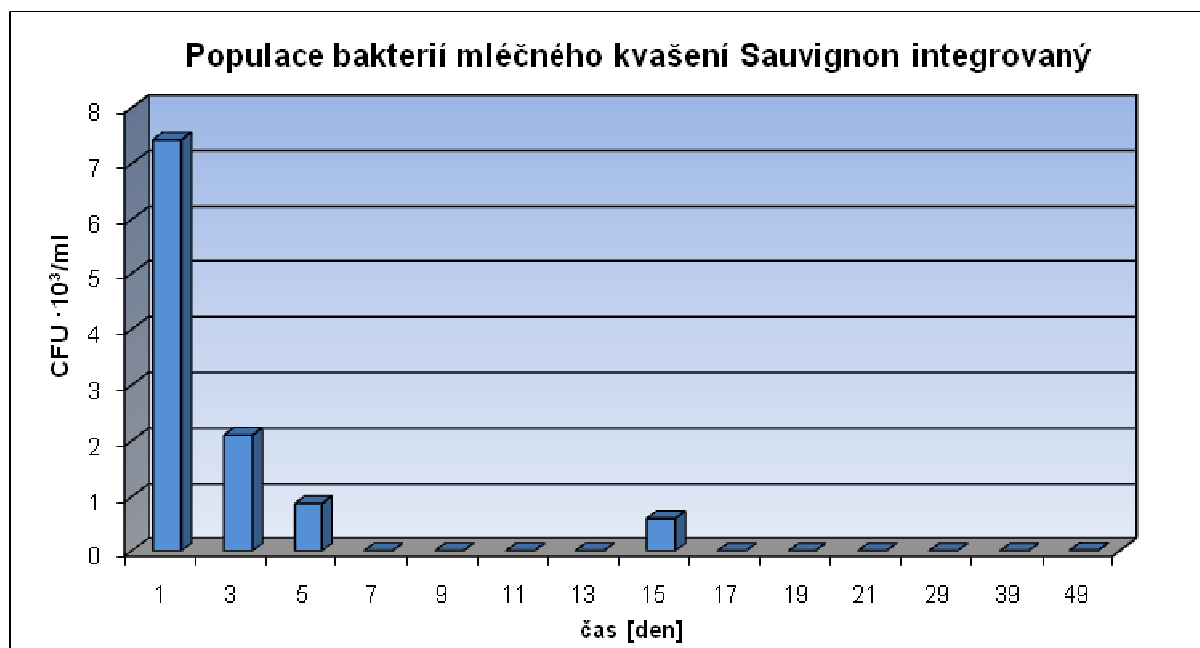


Graf č. 2: Počty bakterií mléčného kvašení v hroznovém moštu během výroby bílého vína odrůdy Sauvignon z ekologické vinice

=> Z grafu č. 2 je zřejmé, že na začátku alkoholového kvašení docházelo k poklesu celkového počtu BMK. První den byl počet bakterií mléčného kvašení $(6,13 \pm 0,08) \cdot 10^3$ CFU/ml. K výraznému zvýšení celkového počtu BMK došlo třináctý den. Od třináctého dne po devatenáctý den se populace bakterií mléčného kvašení pohybovala v rozmezí $(3,03 \pm 0,25) \cdot 10^3$ až $(20,50 \pm 1,00) \cdot 10^3$ CFU/ml.

5.1.3. Výskyt bakterií mléčného kvašení během výroby bílého vína u odrůdy Sauvignon z integrované vinice

Výskyt bakterií mléčného kvašení v hroznovém moštu během výroby vína byl monitorován u odrůdy Sauvignon z integrované vinice od prvního do devětačtyřicátého dne (Graf č. 3).



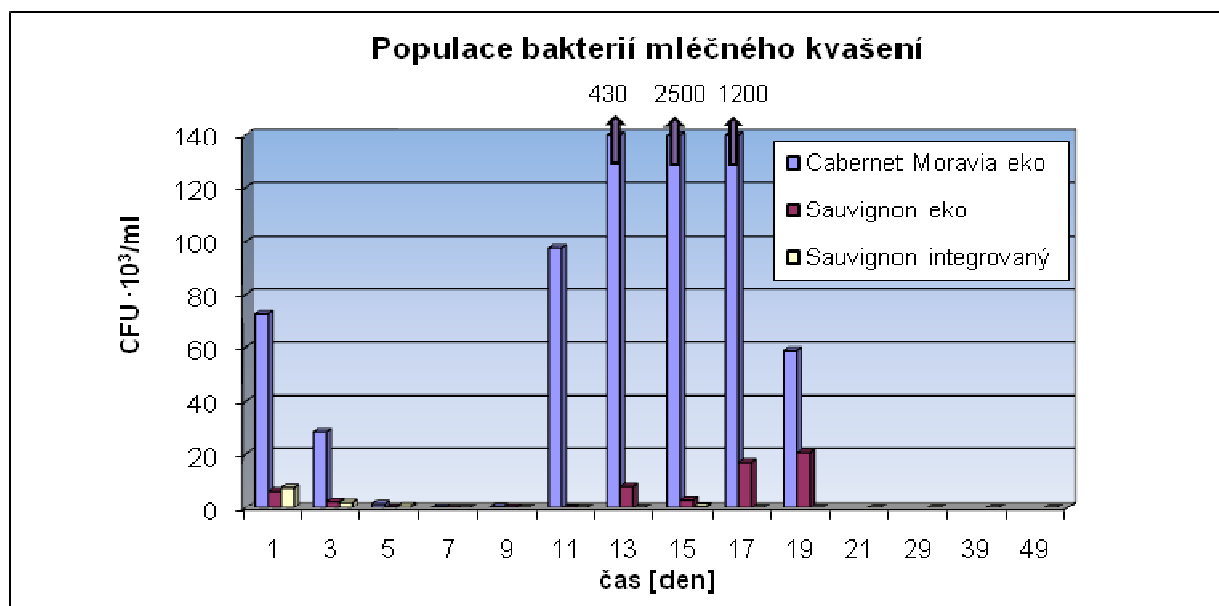
Graf č.3: Počty bakterií mléčného kvašení v hroznovém moštu během výroby bílého vína odrůdy Sauvignon z integrované vinice

=> Z grafu č. 3 je patrné, že na začátku alkoholového kvašení docházelo k poklesu počtu kolonietvorných bakterií. Od sedmého po třináctý den nebylo získáno počitatelné množství BMK. Patnáctý den došlo ke zvýšení počtu kolonietvorných bakterií mléčného kvašení a to na hodnotu $(5,83 \pm 1,58) \cdot 10^2$ CFU/ml. Nicméně od sedmnáctého dne až po devětačtyřicátý již nebylo opět získáno počitatelné množství bakterií.

5.1.4. Srovnání celkového počtu bakterií mléčného kvašení u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice a odrůdy Sauvignon z ekologické a integrované vinice

V grafu č. 4 je znázorněno srovnání počtu bakterií mléčného kvašení v hroznovém moštu během výroby vína u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice a odrůdy Sauvignon z ekologické a integrované vinice.

=> Z grafu č. 4 je patrné, že u všech tří odrůd vína se počet BMK na začátku kvašení snižoval. Nejvyšší počet bakterií mléčného kvašení, jak na počátku tak i během alkoholového kvašení se vyskytoval u červeného vína odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice. Zatímco u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice byl počet BMK první den výroby vína $(7,25 \pm 0,50) \cdot 10^4$ CFU/ml, u odrůdy Sauvignon z ekologické vinice $(6,13 \pm 0,08) \cdot 10^3$ CFU/ml a u odrůdy Sauvignon z integrované vinice byl jejich počet $(7,43 \pm 0,28) \cdot 10^3$ CFU/ml. Počet bakterií mléčného kvašení byl první den u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice o řád vyšší oproti odrůdě Sauvignon jak z ekologické tak i z integrované vinice. V pozdější fázi alkoholového kvašení se počet BMK pohyboval u odrůdy Cabernet Moravia v rozmezí $(5,88 \pm 0,06) \cdot 10^4$ až $(2,50 \pm 0,25) \cdot 10^6$ CFU/ml, u odrůdy Sauvignon z ekologické vinice $(3,03 \pm 0,25) \cdot 10^3$ až $(20,50 \pm 1,00) \cdot 10^3$ CFU/ml a u odrůdy Sauvignon z integrované vinice byly bakterie mléčného kvašení detekovány během alkoholového kvašení pouze patnáctý den a to v počtu $(5,83 \pm 1,58) \cdot 10^2$ CFU/ml.



Graf č. 4: Srovnání počtu bakterií mléčného kvašení během výroby vína odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice a odrůdy Sauvignon z ekologické a integrované vinice

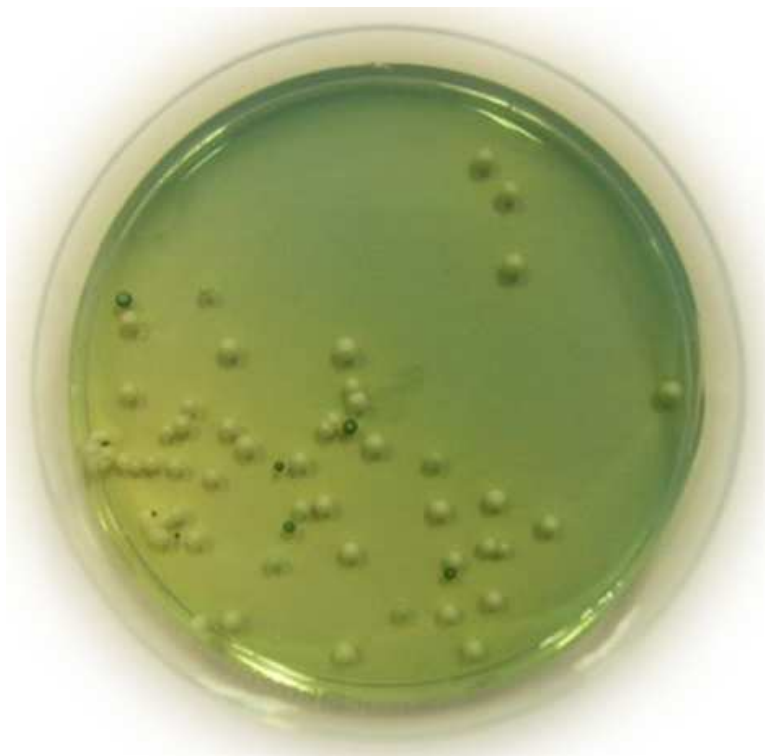
5.2. Izolace čistých kultur bakterií mléčného kvašení

Každá plotna se směsnou kulturou bakterií mléčného kvašení, získaná očkováním odebraného vzorku hroznového moštu na Tomato juice agar při sledování jejich počtu během alkoholového kvašení, byla použita pro izolaci čisté kultury. Nárůst kolonií po kultivaci vzorku hroznového moštu je znázorněn na Obrázku č. 11 a č. 12. Na Obrázku č. 11 a č. 12 můžeme vidět, že na Tomato juice agaru rostly kolonie s hladkým povrchem a smetanovým zabarvením a dále různě zbarvené zelené kolonie. Růstem kolonií se původní světle modrozelená barva agarů odbarvovala do světle žlutého až bezbarvého zabarvení. Odbarvování agarů růstem kolonií je dobře patrné na Obrázku č. 12. Tyto kolonie však tvořily pouze bakterie mléčného kvašení. Při mikroskopování bylo zjištěno, že smetanově zbarvené kolonie tvořily kvasinky a zeleně zbarvené kolonie patřily mléčným bakteriím mléčného kvašení. Ukázka mikroskopického profilu kvasinek narostlých na Tomato juice agaru je znázorněna na Obrázku č. 13. Na Obrázku č. 14 je znázorněna ukázka mikroskopického profilu bakterií mléčného kvašení narostlých na Tomato juice agaru.

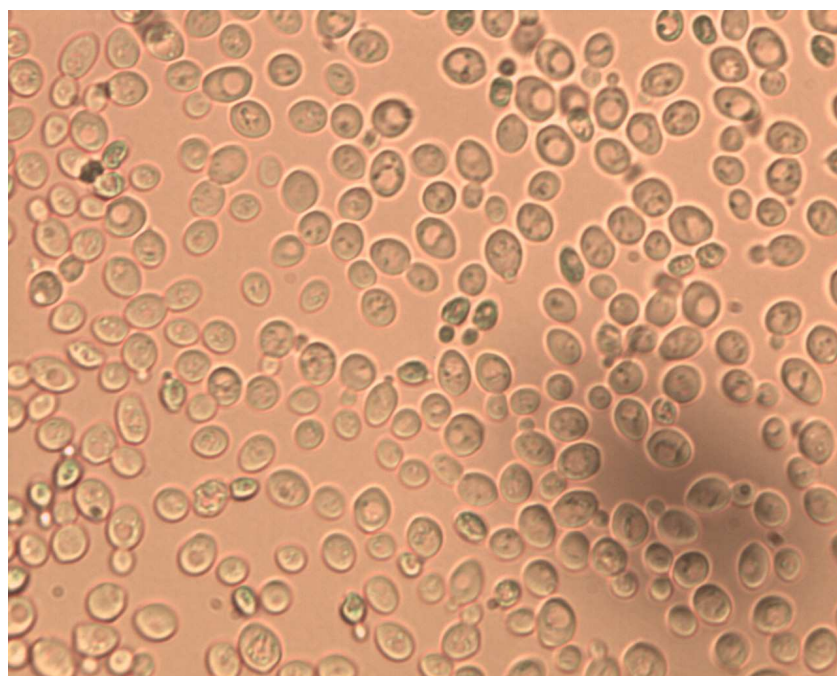
Jednotlivé kolonie bakterií mléčného kvašení, lišící se makroskopickými znaky – barvou, tvarem, profilem a okraji, byly poté přeočkovány na novou Petriho misku tak, že byly rozetřeny po celé ploše a inkubovány dnem vzhůru 24 – 48 hodin při 37 °C. Při samotné izolaci čistých kultur byl používán MRS agar s 0,05% cysteinem. Narostlá kultura byla poté vhodně naředěna a křížovým roztěrem pomocí bakteriologické kličky rozetřena na novou Petriho misku a opět inkubována 24 – 48 hodin při 37 °C. Celý postup byl opakován několikrát až do té doby než byly získány čisté kultury BMK. Takto bylo z hroznových moštů získáno celkem 39 bakteriálních kmenů (KIV1 až KIV39). Ukázka již izolovaných čistých kultur bakterií mléčného kvašení je znázorněna na Obrázku č. 15.



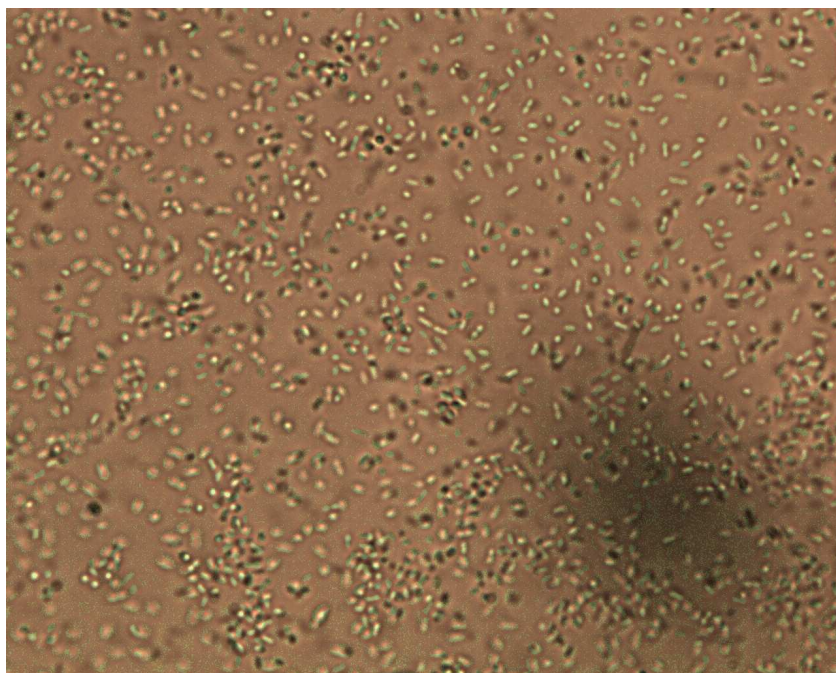
Obr. č. 11: Směsná kultura kvasinek a bakterií mléčného kvašení naočkována na Tomato juice agar



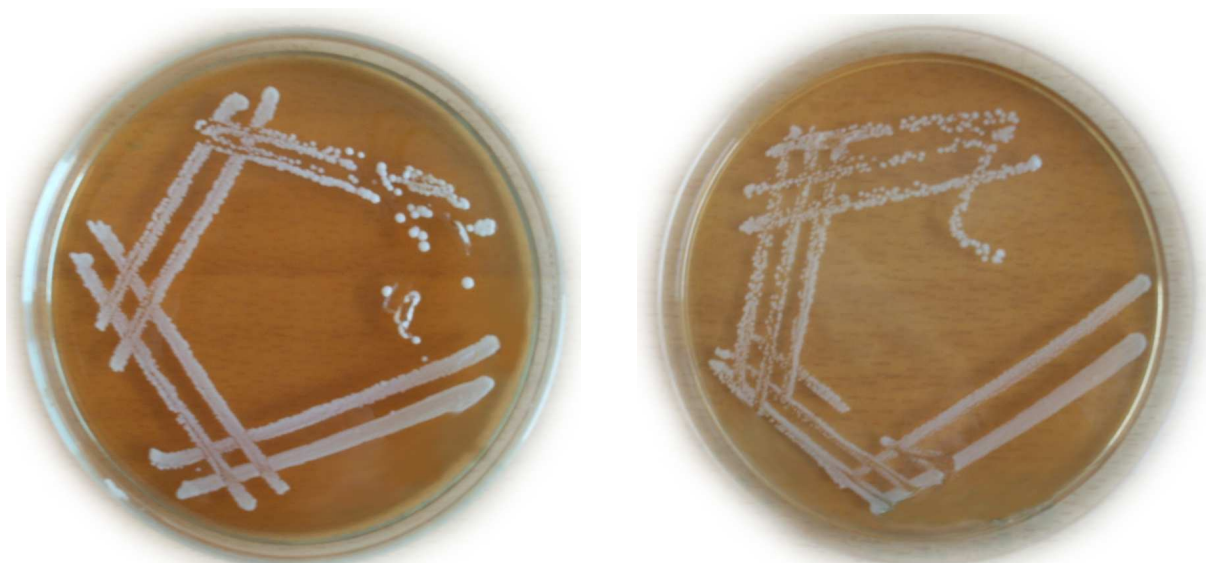
Obr. č. 12: Směsná kultura kvasinek a bakterií mléčného kvašení s náznakem odbarvování Tomato juice agaru



Obr. č. 13: Mikroskopický snímek kvasinek narostlých na Tomato juice agaru (zvětšení 10×60)



Obr. č. 14: Mikroskopický snímek směsné kultury bakterií mléčného kvašení naočkovaných na Tomato juice agar (zvětšení 10×60)



Obr. č. 15: Růst izolovaných čistých kultur bakterií mléčného kvašení naočkovaných na MRS agar s 0,05% cysteinem

5.3. Identifikace izolovaných bakteriálních kmenů pomocí PCR

5.3.1. Kultivace bakterií pro izolaci DNA

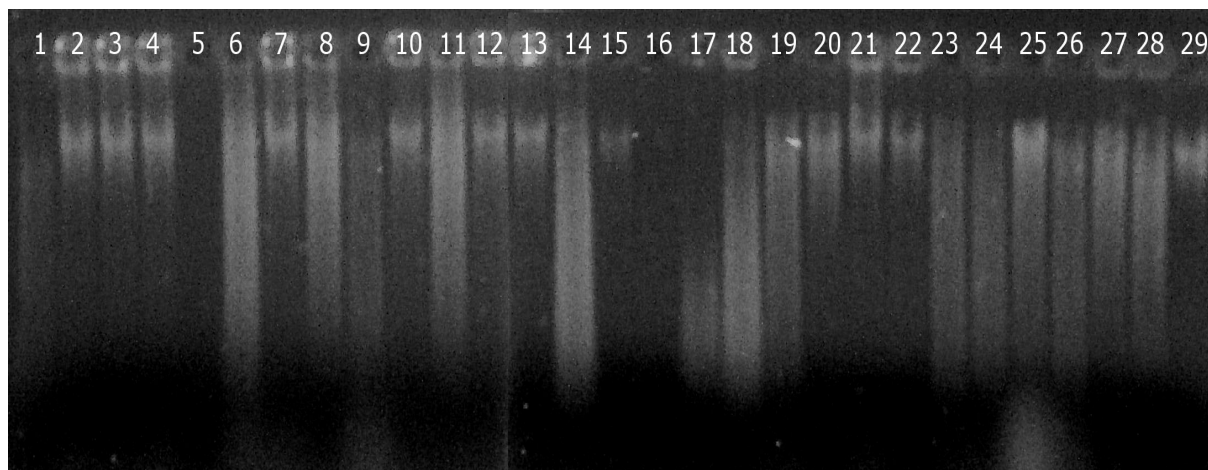
Přečištěné bakteriální kmeny izolované z hroznového moštu (KIV1 až KIV39) a 3 sbírkové kmeny rodu *Lactobacillus* byly kultivovány v tekutém MRS médiu s 0,05% cysteinem. Kultivace probíhala aerobně při 37 °C po dobu 24 – 48 hodin. Takto narostlé bakteriální kultury byly rozočkovány metodou křížového roztěru na pevném MRS médiu s obsahem 0,05% cysteinu a kultivovány aerobně při 37 °C po dobu 24 – 78 hodin.

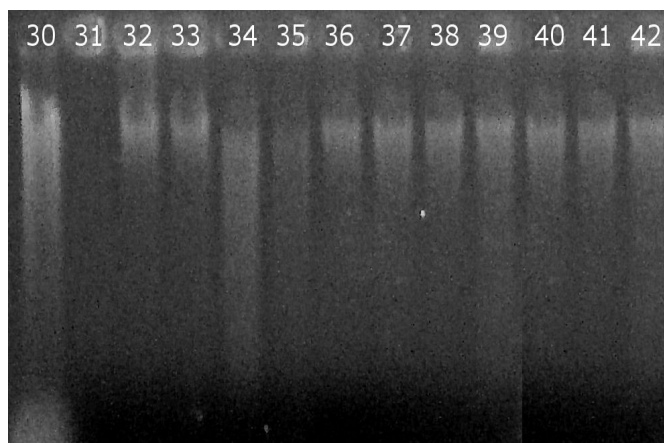
Z bakteriální kultury narostlé v tekutém médiu byly lyzí buněk získány tzv. hrubé lyzáty a z nich poté metodou fenolové extrakce DNA. Kultury narostlé na pevném MRS médiu byly použity pro kontrolu čistoty a u 39 bakteriálních kmenů izolovaných z vína pro rodově specifickou PCR z jedné bakteriální kolonie.

5.3.2. Izolace DNA

DNA byla z kultur bakteriálních kmenů KIV1 až KIV39 izolována metodou fenolové extrakce. Kvalita a intaktnost izolované DNA byla ověřena pomocí agarosové gelové elektroforézy (Obrázek č. 16).

Obr. č. 16: Agarosová gelová elektroforéza DNA (10 µl) 39 bakteriálních kmenů KIV1 až KIV39 izolovaných během výroby vína a 3 sbírkových kmenů. DNA byla izolována metodou fenolové extrakce





Běh	DNA kmene	Detekce DNA	Pozn.	Běh	DNA kmene	Detekce DNA	Pozn.
1	KIV1	+	deg.	22	KIV22	+	int.
2	KIV2	+	int.	23	KIV23	+	deg.
3	KIV3	+	int.	24	KIV24	+	deg.
4	KIV4	+	int.	25	KIV25	+	deg.
5	KIV5	–	–	26	KIV26	+	deg.
6	KIV6	+	deg.	27	KIV27	+	deg.
7	KIV7	+	int.	28	KIV28	+	deg.
8	KIV8	+	deg.	29	KIV29	+	int.
9	KIV9	+	deg.	30	KIV30	+	deg.
10	KIV10	+	int.	31	KIV31	–	–
11	KIV11	+	deg.	32	KIV32	+	int.
12	KIV12	+	int.	33	KIV33	+	int.
13	KIV13	+	int.	34	KIV34	+	deg.
14	KIV14	+	deg.	35	KIV35	+	deg.
15	KIV15	+	int.	36	KIV36	+	int.
16	KIV16	–	–	37	KIV37	+	int.
17	KIV17	+	deg.	38	KIV38	+	int.
18	KIV18	+	deg.	39	KIV39	+	int.
19	KIV19	+	deg.	40	<i>Lb. plantarum</i> CCM 4281	+	int.
20	KIV20	+	int.	41	<i>Lb. casei</i> CCM 4791	+	int.
21	KIV21	+	int.	42	<i>Lb. fermentum</i> CCM 7192	+	int.

+.....DNA byla detekována

–.....DNA nebyla detekována

int.intaktní DNA

deg. ...degradovaná DNA

=> Ze všech bakteriálních kmenů byla vyizolována DNA, u 21 vzorků byla DNA relativně intaktní, u 18 vzorků byla DNA degradována a u 3 vzorků nebyla DNA na gelu detekována.

5.3.3. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

U DNA všech 39 bakteriálních kmenů (KIV1 až KIV39) izolovaných z vína a 3 sbírkových kmenů, izolované metodou fenolové extrakce, byla spektrofotometricky změřena absorbance. Ze změřené absorbance ($A_{260\text{ nm}}$ a $A_{280\text{ nm}}$) byla stanovena koncentrace a bylo vypočítáno celkové množství izolované DNA jednotlivých vzorků. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce č. 10.

Tabulka č. 10: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a množství DNA izolované z 39 KIV kmenů a 3 sbírkových kmenů

DNA kmene	Koncentrace DNA (ng/μl)	A_{260} (nm)	A_{280} (nm)	$A_{260/280}$	Množství DNA (μg)
KIV1	58,5	0,119	0,07	1,721*	11,7
KIV2	179,0	0,357	0,21	1,700*	35,8
KIV3	221,0	0,444	0,255	1,747*	44,2
KIV4	231,0	0,464	0,271	1,717*	46,2
KIV5	52,5	0,249	0,158	1,576*	10,5
KIV6	181,0	0,364	0,211	1,732*	36,2
KIV7	274,0	0,566	0,333	1,737*	54,8
KIV8	124,0	0,25	0,146	1,722*	24,8
KIV9	98,5	0,411	0,219	1,885	19,7
KIV10	211,0	0,424	0,227	1,876	42,2
KIV11	96,0	0,193	0,108	1,794*	19,2
KIV12	236,0	0,476	0,253	1,896	47,2
KIV13	182,0	0,366	0,196	1,881	36,4
KIV14	203,0	0,411	0,248	1,671*	40,6
KIV15	194,0	0,389	0,206	1,897	38,8
KIV16	44,0	0,259	0,143	1,817	8,8
KIV17	64,0	0,127	0,074	1,707*	12,8
KIV18	144,0	0,297	0,176	1,729*	28,8
KIV19	142,0	0,291	0,168	1,759*	28,4
KIV20	358,0	0,718	0,441	1,631*	71,6
KIV21	322,0	0,645	0,405	1,596*	64,4
KIV22	125,0	0,253	0,133	1,93	25,0
KIV23	211,0	0,422	0,223	1,896	42,2
KIV24	457,0	0,915	0,564	1,625*	91,4
KIV25	461,0	0,903	0,552	1,616*	92,2
KIV26	580,0	1,137	0,584	1,913	116,0
KIV27	597,0	1,172	0,631	1,828	119,4
KIV28	477,0	0,931	0,546	1,677*	95,4
KIV29	400,0	0,777	0,47	1,623*	80,0
KIV30	376,0	0,739	0,457	1,599*	75,2
KIV31	52,5	1,025	0,54	1,86	10,5
KIV32	450,0	0,879	0,503	1,719*	90,0

Pokračování Tabulka č. 10: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a množství DNA izolované z 39 KIV kmenů a 3 sbírkových kmenů

DNA kmene	Koncentrace DNA (ng/μl)	A ₂₆₀ (nm)	A ₂₈₀ (nm)	A _{260/280}	Množství DNA (μg)
KIV33	150,0	0,274	0,154	1,670*	30,0
KIV34	238,0	0,453	0,279	1,578*	47,6
KIV35	132,0	0,238	0,134	1,654*	26,4
KIV36	128,0	0,23	0,133	1,614*	25,6
KIV37	156,5	0,146	0,085	1,545*	31,3
KIV38	143,0	0,119	0,063	1,659*	28,6
KIV39	135,0	0,102	0,046	1,836	27,0
<i>Lb. plantarum</i> CCM 4281	511,0	1,02	0,594	1,715*	102,2
<i>Lb. casei</i> CCM 4791	514,0	1,012	0,548	1,824	102,8
<i>Lb. fermentum</i> CCM 7192	223,0	0,122	0,065	1,877	44,6

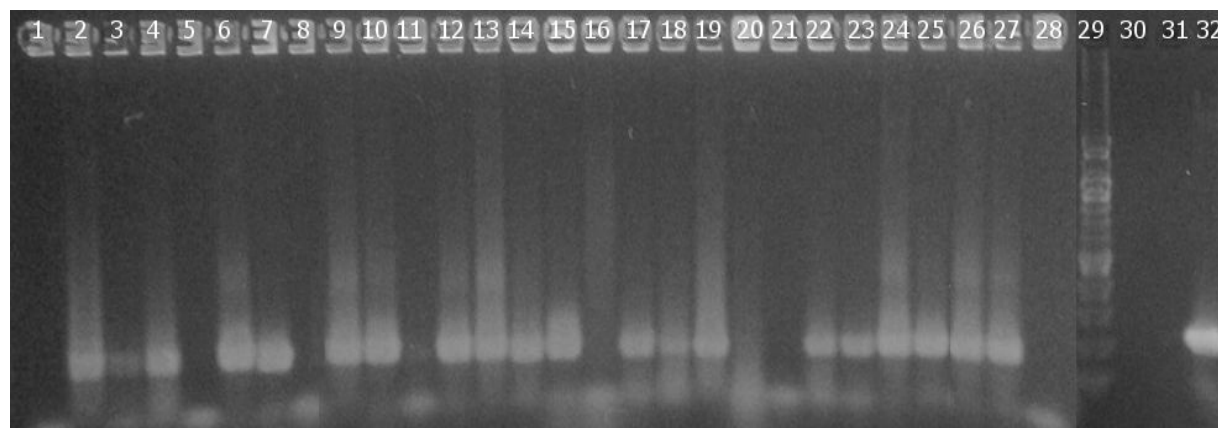
*pravděpodobně znečištění DNA proteiny

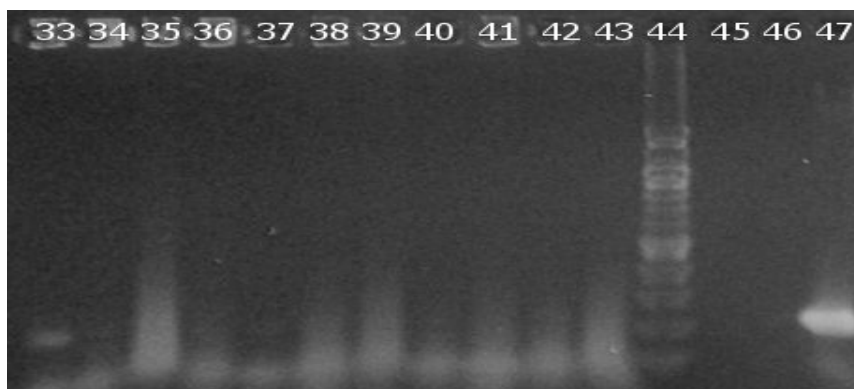
=> DNA byla izolována u všech kmenů v koncentraci 44,0 až 597,0 ng/μl a v celkovém množství 8,8 až 119,4 μg. Poměr absorbancí A₂₆₀/A₂₈₀ u izolované DNA se pohyboval v rozmezí 1,545 až 1,930. U 28 vzorků byla DNA pravděpodobně znečištěná proteiny.

5.3.4. Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus* z 1 bakteriální kolonie

Pro rodově specifickou PCR pro rod *Lactobacillus* z 1 bakteriální kolonie byla použita DNA 39 studovaných kmenů (KIV1 až KIV39) uvolněná lyzí buněk z jedné bakteriální kolonie narostlé na tuhém MRS médiu. Pro PCR byly použity primery LbLMA1-rev a R16-1, byl amplifikován produkt PCR o velikosti přibližně 250 bp. Výsledky rodově specifické PCR izolovaných kmenů jsou uvedeny na Obrázku č. 17.

Obr. č. 17: Agarosová gelová elektroforéza rodově specifických produktů PCR (asi 250 bp) s primery LbLMA1-rev a R16-1. Amplifikována byla DNA z 1 bakteriální kolonie 39 KIV kmenů. Na gel bylo nanášeno 15 μl produktů PCR.





Běh	DNA kmene	Detekce PCR produktu	Běh	DNA kmene	Detekce PCR produktu
1	KIV1	–	25	KIV25	+++
2	KIV2	+++	26	KIV26	+++
3	KIV3	++	27	KIV27	+++
4	KIV4	+++	28	KIV28	–
5	KIV5	–	29	DNA standard	100 bp žebříček
6	KIV6	+++	30	NK	–
7	KIV7	+++	31	NK	–
8	KIV8	–	32	PK	+++
9	KIV9	+++	33	KIV29	+
10	KIV10	+++	34	KIV30	–
11	KIV11	–	35	KIV31	–
12	KIV12	+++	36	KIV32	–
13	KIV13	+++	37	KIV33	–
14	KIV14	+++	38	KIV34	–
15	KIV15	+++	39	KIV35	–
16	KIV16	–	40	KIV36	–
17	KIV17	+++	41	KIV37	–
18	KIV18	+++	42	KIV38	–
19	KIV19	+++	43	KIV39	–
20	KIV20	–	44	DNA standard	100 bp žebříček
21	KIV21	–	45	NK	–
22	KIV22	++	46	NK	–
23	KIV23	++	47	PK	+++
24	KIV24	+++			

+++.....PCR produkt byl detekován silně

++.....PCR produkt detekován zřetelně

+PCR produkt detekován slabě

–PCR produkt nedetekován

NK...negativní kontrola

PK...pozitivní kontrola (*Lactobacillus salivarius* 10 ng/μl)

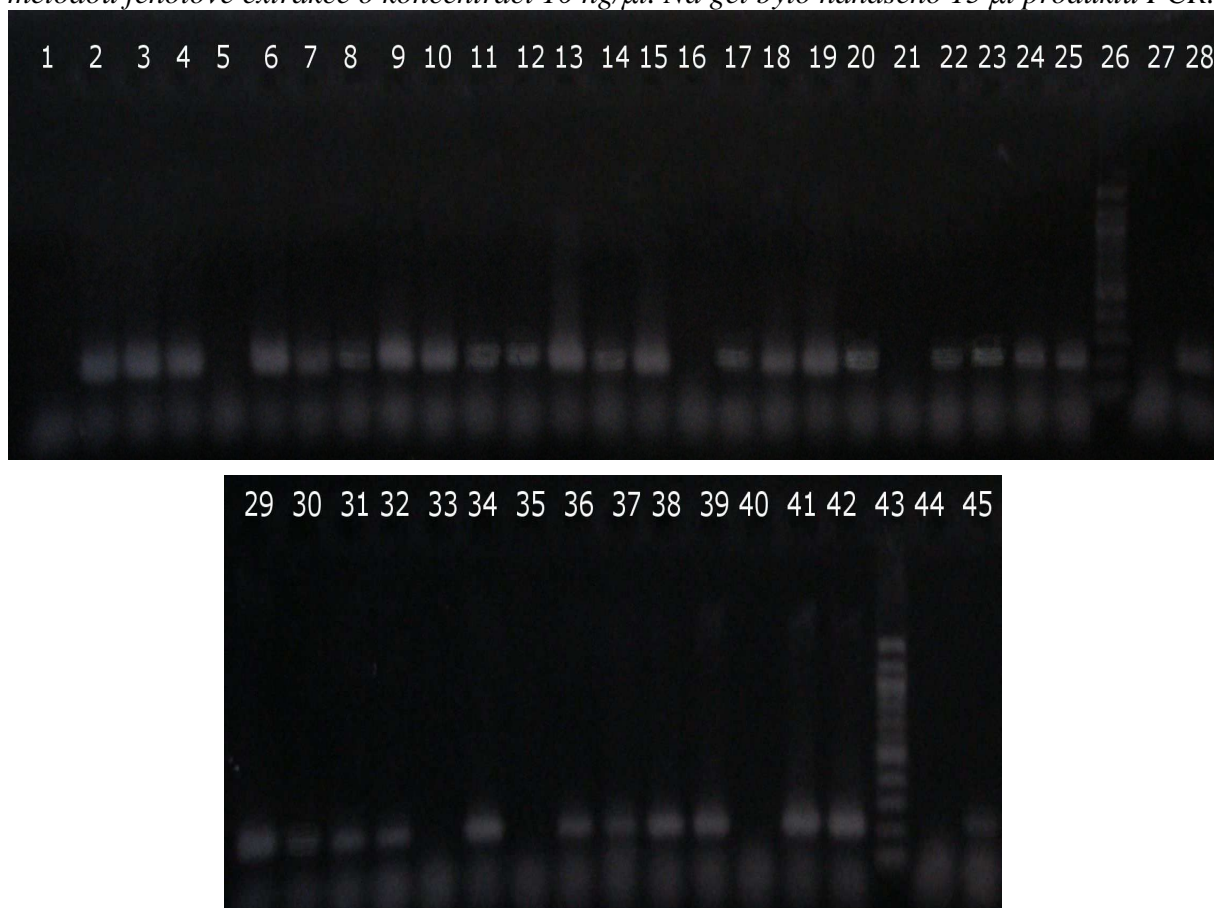
=> Specifické produkty PCR o velikosti přibližně 250 bp byly detekovány u 21 izolovaných bakteriálních kmenů (KIV2 až KIV4, KIV6, KIV7, KIV9, KIV10, KIV12 až KIV15, KIV17

až KIV19, KIV22 až KIV27, KIV29). Rodově specifický produkt PCR nebyl detekován u kmenů KIV1, KIV5, KIV8, KIV11, KIV16, KIV20, KIV21, KIV28, KIV30 až KIV39.

5.3.5. Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus* s purifikovanou DNA matricí

Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus* byla taktéž provedena s DNA 39 studovaných kmenů (KIV1 až KIV39) izolovanou metodou fenolové extrakce o koncentraci 10 ng/μl. Pro PCR byly použity primery LbLMA1-rev a R16-1 specifické pro rod *Lactobacillus*, byl amplifikován produkt PCR o velikosti přibližně 250 bp. Výsledky rodově specifické PCR izolovaných kmenů jsou uvedeny na Obrázku č. 18.

Obr. č. 18: Agarosová gelová elektroforéza rodově specifických produktů PCR (asi 250 bp) s primery LbLMA1-rev a R16-1. K amplifikaci byla použita DNA 39 KIV kmenů purifikovaná metodou fenolové extrakce o koncentraci 10 ng/μl. Na gel bylo nanášeno 15 μl produktů PCR.



Běh	DNA kmene	Detekce PCR produktu	Běh	DNA kmene	Detekce PCR produktu
1	KIV1	–	24	KIV24	++
2	KIV2	+++	25	KIV25	++
3	KIV3	+++	26	DNA standard	100 bp žebříček
4	KIV4	+++	27	NK	–
5	KIV5	–	28	PK	++
6	KIV6	+++	29	KIV26	+++
7	KIV7	++	30	KIV27	++
8	KIV8	++	31	KIV28	++
9	KIV9	+++	32	KIV29	++
10	KIV10	+++	33	KIV30	–
11	KIV11	++	34	KIV31	+++
12	KIV12	++	35	KIV32	–
13	KIV13	+++	36	KIV33	++
14	KIV14	++	37	KIV34	++
15	KIV15	+++	38	KIV35	+++
16	KIV16	–	39	KIV36	+++
17	KIV17	++	40	KIV37	–
18	KIV18	+++	41	KIV38	+++
19	KIV19	+++	42	KIV39	+++
20	KIV20	+++	43	DNA standard	100 bp žebříček
21	KIV21	–	44	NK	–
22	KIV22	++	45	PK	++
23	KIV23	++			

+++....PCR produkt byl detekován silně

++.....PCR produkt detekován zřetelně

+PCR produkt detekován slabě

–PCR produkt nedetekován

NK...negativní kontrola

PK...pozitivní kontrola (*Lactobacillus salivarius* 10 ng/μl)

=> U rodově specifické PCR pro rod *Lactobacillus* s DNA izolovanou fenolovou extrakcí byl specifický produkt PCR o velikosti přibližně 250 bp detekován u 32 z celkového počtu 39 izolovaných bakteriálních kmenů. Rodově specifický produkt PCR nebyl detekován u kmenů KIV1, KIV5, KIV16, KIV21, KIV30, KIV32 a KIV37.

5.3.6. Zařazení kmenů do rodu *Lactobacillus* na základě rodově specifické PCR s využitím různých DNA matic

Zařazení kmenů do rodu *Lactobacillus* na základě rodově specifické PCR provedených s DNA maticí z jedné bakteriální kolonie a purifikovanou DNA je uvedeno v Tabulce č. 11.

Tabulka č. 11: Souhrnné výsledky zařazení 39 KIV kmenů do rodu *Lactobacillus* na základě rodově specifické PCR

DNA kmene	DNA z 1 kolonie	DNA z fenolové extrakce	Rodová identifikace
KIV1	–	–	N
KIV2	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV3	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV4	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV5	–	–	N
KIV6	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV7	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV8	–	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV9	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV10	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV11	–	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV12	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV13	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV14	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV15	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV16	–	–	N
KIV17	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV18	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV19	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV20	–	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV21	–	–	N
KIV22	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV23	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV24	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV25	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV26	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV27	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV28	–	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV29	+	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV30	–	–	N
KIV31	–	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV32	–	–	N
KIV33	–	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV34	–	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV35	–	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV36	–	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV37	–	–	N
KIV38	–	+	<i>Lactobacillus</i>
KIV39	–	+	<i>Lactobacillus</i>

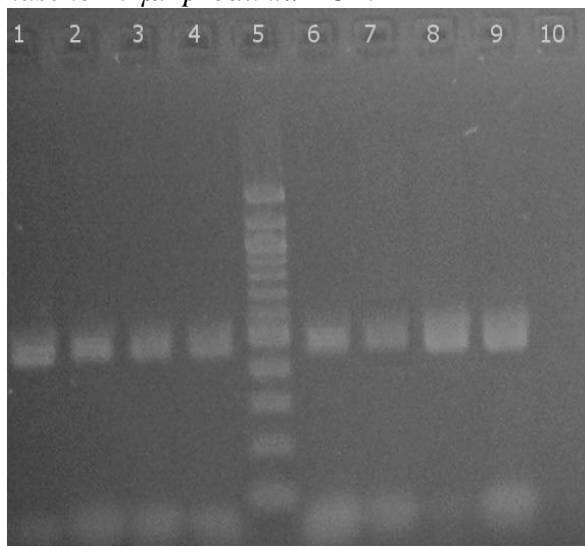
N....kmen nebyl pomocí rodově specifické PCR identifikován, +....PCR produkt byl detekován, –...PCR produkt nebyl detekován

=> Na základě rodově specifické PCR bylo 32 kmenů z celkového počtu 39 bakteriálních kmenů izolovaných z vína zařazeno do rodu *Lactobacillus*. Do rodu *Lactobacillus* nebyly zařazeny kmeny KIV1, KIV5, KIV16, KIV21, KIV30, KIV32 a KIV37.

5.3.7. PCR pro doménu *Bacteria*

PCR pro doménu *Bacteria* byla provedena za účelem ověření amplifikovatelnosti DNA se 7 bakteriálními kmeny (KIV1, KIV5, KIV16, KIV21, KIV30, KIV32, KIV37), u nichž nebyl detekován rodově specifický produkt PCR (asi 250 bp) pro rod *Lactobacillus*. Pro PCR byly použity primery F eub a R eub, velikost specifického produktu PCR byla přibližně 466 bp. K amplifikaci byla použita DNA o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku č. 19.

Obr. č. 19: Agarosová gelová elektroforéza doménově specifických produktů PCR (466 bp) s primery F eub a R eub. K amplifikaci byla použita DNA 7 KIV kmenů o koncentraci 10 ng/μl. Na gel bylo nanášeno 15 μl produktů PCR.



Běh	DNA kmene	Detekce PCR produktu
1	KIV1	++
2	KIV5	++
3	KIV16	++
4	KIV21	++
5	DNA standard	100 bp žebříček
6	KIV30	++
7	KIV32	++
8	KIV37	+++
9	PK	+++
10	NK	–

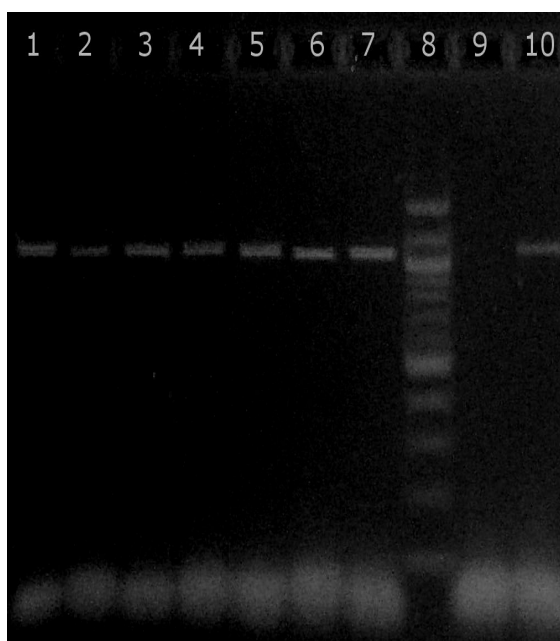
+++....PCR produkt byl detekován silně
 ++.....PCR produkt detekován zřetelně
 +PCR produkt detekován slabě
 –PCR produkt nedetekován
 NK...negativní kontrola
 PK...pozitivní kontrola (*Lactobacillus salivarius* 10 ng/μl)

=> Specifický produkt PCR pro doménu *Bacteria* o velikosti 466 bp byl detekován ve vysoké intenzitě u všech 7 kmenů (KIV1, KIV5, KIV16, KIV21, KIV30, KIV32, KIV37).

5.3.8. Druhově specifická PCR pro *Oenococcus oeni*

Pro druhově specifickou PCR pro druh *Oenococcus oeni*, bakterii mléčného kvašení převážně řídící malolaktické kvašení během výroby vína, byla použita DNA bakteriálních kmenů, u nichž nebyl detekován rodově specifický produkt PCR (asi 250 bp) pro rod *Lactobacillus* a u nichž byla ověřena amplifikovatelnost DNA pomocí PCR pro doménu *Bacteria*. Pro PCR byly použity primery On1 a On2, velikost specifického produktu PCR byla přibližně 1025 bp. K amplifikaci byla použita DNA vybraných bakteriálních kmenů o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku č. 20.

Obr. č. 20: Agarosová gelová elektroforéza specifických PCR produktů pro druh *Oenococcus oeni* (1025 bp) s primery On1 a On2. Amplifikována byla DNA o koncentraci 10 ng/μl. Na gel bylo nanášeno 15 μl produktů PCR.



Běh	DNA kmene	Detekce PCR produktu
1	KIV1	++
2	KIV5	++
3	KIV16	++
4	KIV21	++
5	KIV30	++
6	KIV32	++
7	KIV37	++
8	DNA standard	100 bp žebříček
9	PK	++
10	NK	–

+++....PCR produkt byl detekován silně

++.....PCR produkt detekován zřetelně

+PCR produkt detekován slabě

–PCR produkt nedetekován

NK...negativní kontrola

PK...pozitivní kontrola (*Oenococcus oeni* 10 ng/μl)

=> V druhově specifické PCR pro druh *Oenococcus oeni* byl detekován specifický produkt PCR (asi 1025 bp) u všech 7 testovaných bakteriálních kmenů (KIV1, KIV5, KIV16, KIV21, KIV30, KIV32, KIV37).

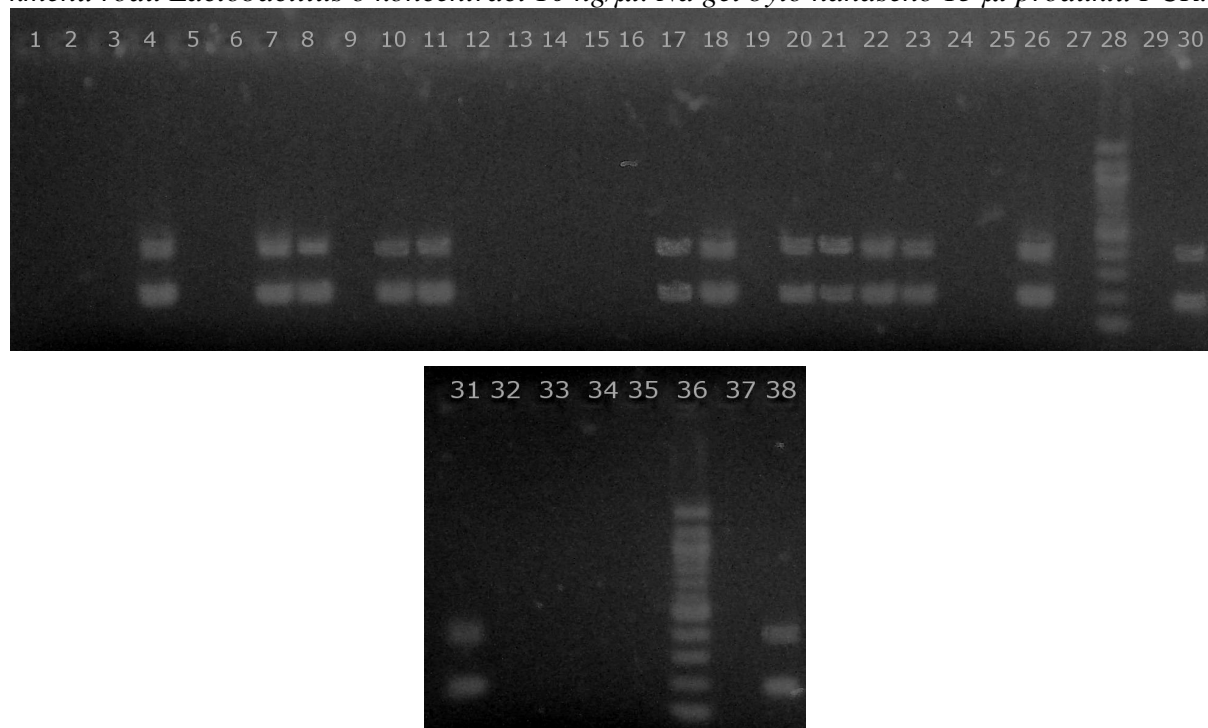
5.3.9. Druhová identifikace bakterií rodu *Lactobacillus* pomocí PCR

V druhově specifických PCR pro zařazení bakterií mléčného kvašení rodu *Lactobacillus* byla použita DNA 32 KIV kmenů izolovaných během výroby vína a identifikovaných jako kmeny rodu *Lactobacillus*.

5.3.9.1. Druhově specifická PCR pro *Lactobacillus casei/paracasei*

Druhově specifická PCR pro druhy *Lactobacillus casei/paracasei* byla uskutečněna pomocí primerů PrI a CasII, amplifikovaly se dva produkty PCR o velikosti přibližně 400 a 200 bp. K amplifikaci byla použita DNA 32 bakteriálních kmenů, identifikovaných jako kmeny rodu *Lactobacillus*, o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agarósové gelové elektroforézy produktů PCR jsou uvedeny na Obrázku č. 21.

Obr. č. 21: Agarosová gelová elektroforéza specifických produktů PCR (400 a 200 bp) pro druhy *Lb. casei/paracasei* s primery *PrI* a *CasII*. K amplifikaci byla použita DNA 32 KIV kmenů rodu *Lactobacillus* o koncentraci 10 ng/μl. Na gel bylo nanášeno 15 μl produktů PCR.



Běh	DNA kmene	Detekce PCR produktu	Běh	DNA kmene	Detekce PCR produktu
1	KIV2	–	20	KIV24	+++
2	KIV3	–	21	KIV25	+++
3	KIV4	–	22	KIV26	+++
4	KIV6	+++	23	KIV27	+++
5	KIV7	–	24	KIV28	–
6	KIV8	–	25	KIV29	–
7	KIV9	+++	26	KIV31	+++
8	KIV10	++	27	KIV33	–
9	KIV11	–	28	DNA standard	100 bp žebříček
10	KIV12	+++	29	NK	–
11	KIV13	+++	30	PK	+++
12	KIV14	–	31	KIV34	+++
13	KIV15	–	32	KIV35	–
14	KIV17	–	33	KIV36	–
15	KIV18	–	34	KIV38	–
16	KIV19	–	35	KIV39	–
17	KIV20	+++	36	DNA standard	100 bp žebříček
18	KIV22	+++	37	NK	–
19	KIV23	–	38	PK	+++

+++....PCR produkt byl detekován silně

++.....PCR produkt detekován zřetelně

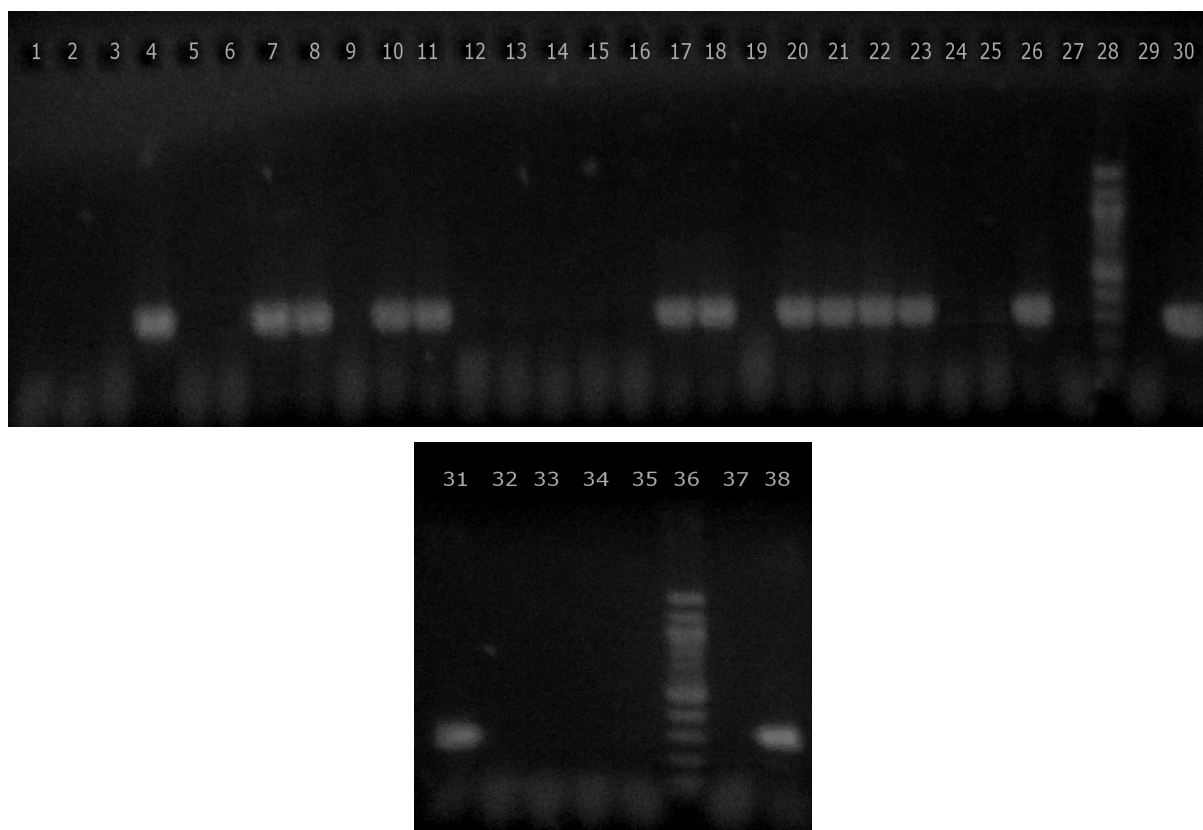
+PCR produkt detekován slabě
 –PCR produkt nedetekován
 NK...negativní kontrola
 PK...pozitivní kontrola (*Lactobacillus casei* 10 ng/μl)

=> V druhově specifické PCR pro *Lactobacillus casei/paracasei* byly detekovány specifické produkty PCR (400 a 200 bp) u 13 kmenů (KIV6, KIV9, KIV10, KIV12, KIV13, KIV20, KIV22, KIV24, KIV25, KIV26, KIV27, KIV31, KIV34).

5.3.9.2. Druhově specifická PCR pro *Lactobacillus paracasei*

Druhově specifická PCR pro *Lactobacillus paracasei* byla provedena s DNA 32 bakteriálních kmenů, u nichž byl detekován rodově specifický produkt PCR (250 bp) pro rod *Lactobacillus*. Pro PCR byly použity primery Y2 a paracasei a velikost specifického produktu byla přibližně 290 bp. K amplifikaci byla použita DNA o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku č. 22.

Obr. č. 22: Agarosová gelová elektroforéza specifických produktů PCR (asi 290 bp) pro druh *Lb. paracasei* s primery Y2 a paracasei. Amplifikována byla DNA 32 KIV kmenů rodu *Lactobacillus* o koncentraci 10 ng/μl. Na gel bylo nanášeno 15 μl produktů PCR.



Běh	DNA kmene	Detekce PCR produktu	Běh	DNA kmene	Detekce PCR produktu
1	KIV2	–	20	KIV24	+++
2	KIV3	–	21	KIV25	+++
3	KIV4	–	22	KIV26	+++
4	KIV6	+++	23	KIV27	+++
5	KIV7	–	24	KIV28	–
6	KIV8	–	25	KIV29	–
7	KIV9	+++	26	KIV31	+++
8	KIV10	+++	27	KIV33	–
9	KIV11	–	28	DNA standard	100 bp žebříček
10	KIV12	+++	29	NK	–
11	KIV13	+++	30	PK	+++
12	KIV14	–	31	KIV34	+++
13	KIV15	–	32	KIV35	–
14	KIV17	–	33	KIV36	–
15	KIV18	–	34	KIV38	–
16	KIV19	–	35	KIV39	–
17	KIV20	+++	36	DNA standard	100 bp žebříček
18	KIV22	+++	37	NK	–
19	KIV23	–	38	PK	+++

+++....PCR produkt byl detekován silně

++.....PCR produkt detekován zřetelně

+PCR produkt detekován slabě

–PCR produkt nedetekován

NK...negativní kontrola

PK...pozitivní kontrola (*Lactobacillus paracasei* 10 ng/μl)

=> V druhově specifické PCR pro *Lactobacillus paracasei* byl detekován specifický produkt PCR (290 bp) u 13 kmenů (KIV6, KIV9, KIV10, KIV12, KIV13, KIV20, KIV22, KIV24, KIV25, KIV26, KIV27, KIV31, KIV34) z 32 bakteriálních kmenů identifikovaných jako kmeny rodu *Lactobacillus*.

5.3.9.3. Optimalizace druhově specifické PCR pro druh *Lactobacillus plantarum*

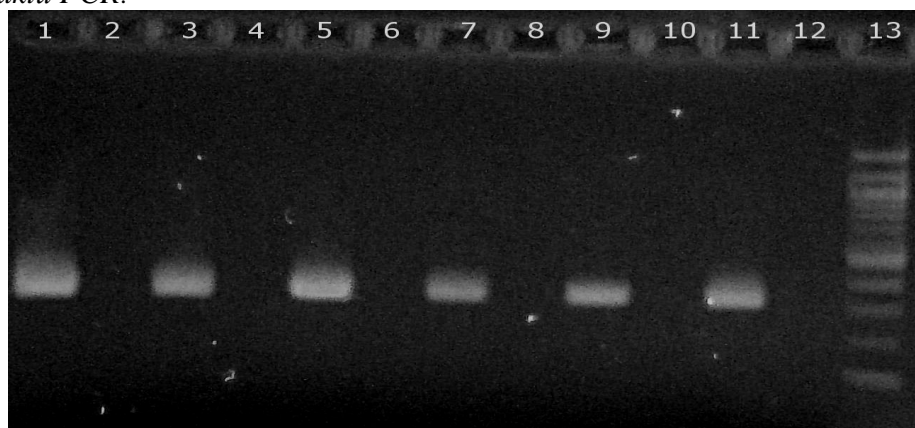
DNA z čisté kultury *Lactobacillus plantarum* CCM 4281, izolovaná metodou fenolové extrakce, byla naředěna TE pufrem na koncentraci 10 ng/μl a následně amplifikována s druhově specifickými primery planF a pREV, velikost specifického produktu PCR byla přibližně 318 bp. Při optimalizaci bylo hledáno optimální složení PCR směsi, složení použitých PCR směsí je uvedeno v Tabulce č. 12. Výsledky agarosové gelové elektroforézy druhově specifických produktů PCR získaných při optimalizaci jsou uvedeny na Obrázku č. 23.

Tabulka č. 12: Složení PCR směsí použitých při optimalizaci druhově specifické PCR pro druh *Lb. plantarum*

Komponenta PCR	Běh											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PCR voda (μl)	17,5	18,5	18,5	19,5	18,5	19,5	19,5	20,5	18,0	19,0	19,0	20,0
10 × reakční pufr kompletní (μl)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
směs dNTP* (μl)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5
Primery* (μl)	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5
Taq DNA polymerasa* (μl)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0
DNA matrice (10 ng/μl) (μl)	1,0	0	1,0	0	1,0	0	1,0	0	1,0	0	1,0	0

*koncentrace PCR komponent viz kap. 4.1.5.

Obr. č. 23: Agarosová gelová elektroforéza specifických produktů PCR (318 bp) pro druh *Lb. plantarum* s primery *planF* a *pREV* získaných při optimalizaci PCR směsí. Amplifikována byla DNA *Lactobacillus plantarum* CCM 4281 o koncentraci 10 ng/μl. Na gel bylo nanášeno 15 μl produktů PCR.



Běh	DNA kmene (10 ng/μl)	Komponenta PCR směsi (μl)			Detekce PCR produktu
		dNTP*	Primery*	Taq DNA polymerasa*	
1	<i>Lb. plantarum</i> CCM 4281	1,0	1,0	1,0	++++
2	NK	1,0	1,0	1,0	–
3	<i>Lb. plantarum</i> CCM 4281	1,0	0,5	1,0	+++
4	NK	1,0	0,5	1,0	–
5	<i>Lb. plantarum</i> CCM 4281	0,5	1,0	0,5	+++
6	NK	0,5	1,0	0,5	–
7	<i>Lb. plantarum</i> CCM 4281	0,5	0,5	0,5	+++
8	NK	0,5	0,5	0,5	–
9	<i>Lb. plantarum</i> CCM 4281	1,0	1,0	0,5	+++

Běh	DNA kmene (10 ng/μl)	Komponenta PCR směsi (μl)			Detekce PCR produktu
		dNTP*	Primery*	Taq DNA polymerasa*	
10	NK	1,0	1,0	0,5	–
11	<i>Lb. plantarum</i> CCM 4281	0,5	0,5	1,0	+++
12	NK	0,5	0,5	1,0	–
13	DNA standard				100 bp žebříček

*koncentrace PCR komponent viz kap. 4.1.5.

++++.....PCR produkt byl detekován velmi silně

+++.....PCR produkt byl detekován silně

++.....PCR produkt detekován zřetelně

+PCR produkt detekován slabě

–PCR produkt nedetekován

NK...negativní kontrola

=> Jako optimální složení PCR směsi při optimalizaci druhově specifické PCR pro druh *Lb. plantarum* bylo zvoleno složení PCR směsi produktu PCR v běhu č. 7 (19,5 μl PCR vody, 2,5 μl 10 × reakčního pufru kompletního, 0,5 μl dNTP, 0,5 μl primerů, 0,5 μl Taq DNA polymerasy a 1,0 μl DNA matrice).

5.3.9.4. Druhově specifická PCR pro *Lactobacillus plantarum*

PCR pro druh *Lactobacillus plantarum* byla provedena s DNA 32 bakteriálních kmenů, u nichž byl detekován rodově specifický produkt PCR (asi 250 bp) pro rod *Lactobacillus*, včetně kmenů, u nichž byl detekován specifický produkt PCR (asi 290 bp) pro druh *Lactobacillus paracasei* ze účelem ověření, zda nereagují zkříženě. PCR byla provedena za použití primerů planF a pREV, velikost specifického produktu PCR byla přibližně 318 bp. K amplifikaci byla použita DNA o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku č. 24.

Obr. č. 24: Agarosová gelová elektroforéza specifických produktů PCR (318 bp) pro druh *Lb. plantarum* s primery planF a pREV. Amplifikována byla DNA 32 KIV kmenů rodu *Lactobacillus* o koncentraci 10 ng/μl. Na gel bylo nanášeno 15 μl produktů PCR.





Běh	DNA kmene	Detekce PCR produktu	Běh	DNA kmene	Detekce PCR produktu
1	KIV2	+++	20	KIV24	–
2	KIV3	+++	21	KIV25	–
3	KIV4	+++	22	KIV26	–
4	KIV6	–	23	KIV27	–
5	KIV7	+++	24	KIV28	+++
6	KIV8	–	25	KIV29	+++
7	KIV9	–	26	KIV31	–
8	KIV10	–	27	KIV33	–
9	KIV11	–	28	DNA standard	100 bp žebříček
10	KIV12	–	29	NK	–
11	KIV13	–	30	PK	+++
12	KIV14	–	31	KIV34	–
13	KIV15	+++	32	KIV35	–
14	KIV17	–	33	KIV36	–
15	KIV18	+++	34	KIV38	–
16	KIV19	+++	35	KIV39	–
17	KIV20	–	36	DNA standard	100 bp žebříček
18	KIV22	–	37	NK	–
19	KIV23	+++	38	PK	+++

+++....PCR produkt byl detekován silně

++.....PCR produkt detekován zřetelně

+PCR produkt detekován slabě

–PCR produkt nedetekován

NK...negativní kontrola

PK...pozitivní kontrola (*Lactobacillus plantarum* 10 ng/μl)

=> V druhově specifické PCR pro *Lactobacillus plantarum* byl detekován specifický produkt PCR (asi 318 bp) u 10 kmenů (KIV2, KIV3, KIV4, KIV7, KIV15, KIV18, KIV19, KIV23, KIV28, KIV29) z 32 bakteriálních kmenů identifikovaných jako kmeny rodu *Lactobacillus*.

5.3.9.5. Optimalizace druhově specifické PCR pro druh *Lactobacillus fermentum*

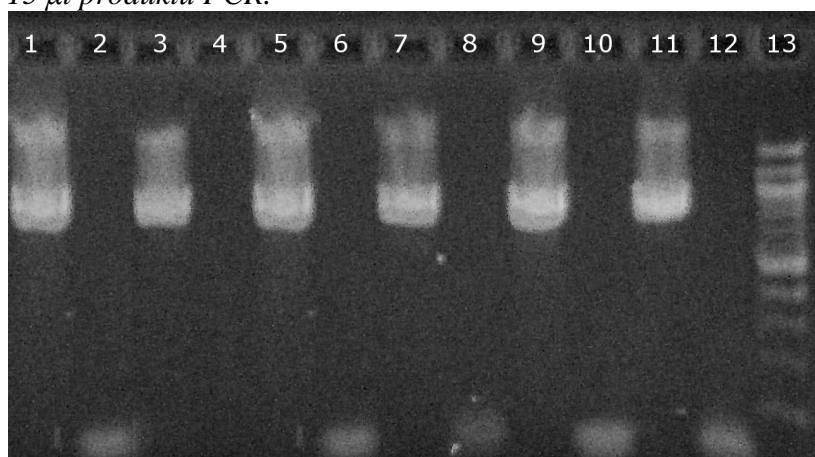
DNA z čisté kultury *Lactobacillus fermentum* CCM 7192, izolovaná metodou fenolové extrakce, byla naředěna TE pufrem na koncentraci 10 ng/μl a následně amplifikována s druhově specifickými primery FERM a LOWLAC, velikost specifického produktu PCR byla přibližně 900 bp. Cílem optimalizace bylo nalezení optimálního složení PCR směsi, složení použitých PCR směsí je uvedeno v Tabulce č. 13. Výsledky agarosové gelové elektroforézy druhově specifických PCR produktů získaných při optimalizaci jsou uvedeny na Obrázku č. 25 a č. 26.

Tabulka č. 13: Složení PCR směsí použitých při optimalizaci druhově specifické PCR pro druh *Lb. plantarum*

Komponenta PCR	Běh											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PCR voda (μl)	17,5	18,5	18,5	19,5	18,5	19,5	19,5	20,5	18,0	19,0	19,0	20,0
10 × reakční pufr kompletní (μl)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
směs dNTP* (μl)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5
Primery* (μl)	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5
<i>Taq</i> DNA polymerasa* (μl)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0
DNA matrice (10 ng/μl) (μl)	1,0	0	1,0	0	1,0	0	1,0	0	1,0	0	1,0	0

*koncentrace PCR komponent viz kap. 4.1.5.

Obr. č. 25: Agarosová gelová elektroforéza druhově specifických produktů PCR (900 bp) pro druh *Lb. fermentum* s primery FERM a LOWLAC získaných při optimalizaci PCR směsi. Amplifikována byla DNA *Lactobacillus fermentum* CCM 7192 o koncentraci 10 ng/μl. Na gel bylo nanášeno 15 μl produktů PCR.



Běh	DNA kmene (10 ng/μl)	Komponenta PCR směsi (μl)			Detekce PCR produktu
		dNTP*	Primery*	Taq DNA polymerasa*	
1	<i>Lb. fermentum</i> CCM 7192	1,0	1,0	1,0	++++
2	NK	1,0	1,0	1,0	–
3	<i>Lb. fermentum</i> CCM 7192	1,0	0,5	1,0	++++
4	NK	1,0	0,5	1,0	–
5	<i>Lb. fermentum</i> CCM 7192	0,5	1,0	0,5	++++
6	NK	0,5	1,0	0,5	–
7	<i>Lb. fermentum</i> CCM 7192	0,5	0,5	0,5	++++
8	NK	0,5	0,5	0,5	–
9	<i>Lb. fermentum</i> CCM 7192	1,0	1,0	0,5	++++
10	NK	1,0	1,0	0,5	–
11	<i>Lb. fermentum</i> CCM 7192	0,5	0,5	1,0	++++
12	NK	0,5	0,5	1,0	–
13	DNA standard				100 bp žebříček

*koncentrace PCR komponent viz kap. 4.1.5.

++++.....PCR produkt byl detekován velmi silně

+++.....PCR produkt byl detekován silně

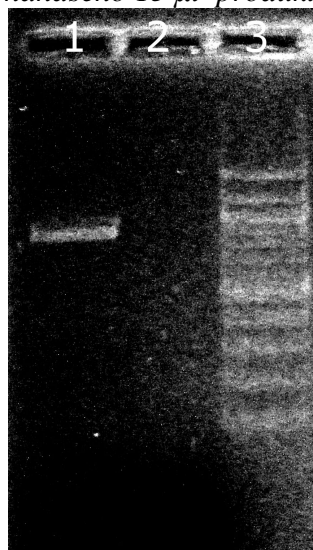
++.....PCR produkt detekován zřetelně

+PCR produkt detekován slabě

–PCR produkt nedetekován

NK...negativní kontrola

Obr. č. 26: Agarosová gelová elektroforéza druhově specifického produktu PCR (900 bp) pro druh *Lb. fermentum* s primery FERM a LOWLAC získaného při optimalizaci PCR směsi. Amplifikována byla DNA čisté kultury *Lactobacillus fermentum* CCM 7192 o koncentraci 1 ng/μl. Na gel bylo nanášeno 15 μl produktu PCR.



Běh	DNA kmene (1 ng/μl)	Komponenta PCR směsi (μl)			Detekce PCR produktu
		dNTP*	Primery*	Taq DNA polymerasa*	
1	<i>Lb. fermentum</i> CCM 7192	0,5	0,5	0,5	++
2	NK	0,5	0,5	0,5	–
3	DNA standard				100 bp žebříček

*koncentrace PCR komponent viz kap. 4.1.5.

++++.....PCR produkt byl detekován velmi silně

+++.....PCR produkt byl detekován silně

++.....PCR produkt detekován zřetelně

+PCR produkt detekován slabě

–PCR produkt nedetekován

NK...negativní kontrola

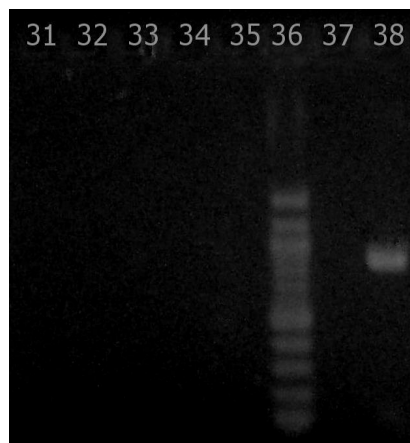
=> Při použití DNA o koncentraci 10 ng/μl byl ve všech případech specifický produkt PCR pro druh *Lb. fermentum* detekován příliš silně. Produkt PCR získaný po naředění DNA na koncentraci 1 ng/μl (při použití PCR směsi obsahující 0,5 μl dNTP, 0,5 μl primerů a 0,5 μl Taq DNA polymerasy) byl při agarosové gelové elektroforéze detekován v optimálním množství. Jako optimální složení PCR směsi byla zvolena PCR směs obsahující 20,5 μl PCR vody, 2,5 μl 10 × reakčního pufru kompletního, 0,5 μl dNTP, 0,5 μl primerů, 0,5 μl Taq DNA polymerasy a 1 μl DNA matrice o koncentraci 1 ng/μl.

5.3.9.6. Druhově specifická PCR pro *Lactobacillus fermentum*

V druhově specifické PCR pro *Lactobacillus fermentum* byla použita DNA všech 32 bakteriálních kmenů, které byly na základě rodově specifické PCR zařazeny do rodu *Lactobacillus*, včetně kmenů, které již byly zařazeny do jiných druhů a to za účelem ověření zda nereagují zkříženě. PCR byla provedena s primery FERM1 a LOWLAC, byl amplifikován specifický produkt PCR o velikosti přibližně 900 bp. K amplifikaci byla použita DNA o koncentraci 1 ng/μl. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku č. 27.

Obr. č. 27: Agarosová gelová elektroforéza specifických produktů PCR (900 bp) *Lb. fermentum* s primery FERM1 a LOWLAC. Amplifikována byla DNA 32 KIV kmenů rodu *Lactobacillus* o koncentraci 1 ng/μl. Na gel bylo nanášeno 15 μl produktů PCR.





Běh	DNA kmene	Detekce PCR produktu	Běh	DNA kmene	Detekce PCR produktu
1	KIV2	–	20	KIV24	–
2	KIV3	–	21	KIV25	–
3	KIV4	–	22	KIV26	–
4	KIV6	–	23	KIV27	–
5	KIV7	–	24	KIV28	–
6	KIV8	–	25	KIV29	–
7	KIV9	–	26	KIV31	–
8	KIV10	–	27	KIV33	+++
9	KIV11	+++	28	DNA standard	100 bp žebříček
10	KIV12	–	29	NK	–
11	KIV13	–	30	PK	+++
12	KIV14	–	31	KIV34	–
13	KIV15	–	32	KIV35	–
14	KIV17	–	33	KIV36	–
15	KIV18	–	34	KIV38	–
16	KIV19	–	35	KIV39	–
17	KIV20	–	36	DNA standard	100 bp žebříček
18	KIV22	–	37	NK	–
19	KIV23	–	38	PK	+++

+++....PCR produkt byl detekován silně

++.....PCR produkt detekován zřetelně

+PCR produkt detekován slabě

–PCR produkt nedetekován

NK...negativní kontrola

PK...pozitivní kontrola (*Lactobacillus fermentum* 1 ng/μl)

=> V druhově specifické PCR pro *Lactobacillus fermentum* byl detekován specifický produkt PCR (asi 900 bp) u 2 kmenů (KIV11 a KIV33) z 32 bakteriálních kmenů identifikovaných jako kmeny rodu *Lactobacillus*.

5.3.9.7. Zařazení kmenů KIV1 – KIV39 do druhů na základě druhově specifických PCR

Na základě druhově specifických PCR byly bakteriální kmeny KIV izolované z vína zařazeny do druhů *O. oeni*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* a *Lb. fermentum* (Tabulka č. 14).

Tabulka č. 14: Souhrnná tabulka rodové a druhové identifikace 39 bakteriálních kmenů

DNA kmene	Rodová identifikace	Doména <i>Bacteria</i>	<i>O. oeni</i>	<i>Lb. casei/paracasei</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>	Druhová identifikace
KIV (1)	–	+	+					<i>O. oeni</i>
KIV (2)	<i>Lb.</i>			–	–	+	–	<i>Lb. plantarum</i>
KIV (3)	<i>Lb.</i>			–	–	+	–	<i>Lb. plantarum</i>
KIV (4)	<i>Lb.</i>			–	–	+	–	<i>Lb. plantarum</i>
KIV (5)	–	+	+					<i>O. oeni</i>
KIV (6)	<i>Lb.</i>			+	+	–	–	<i>Lb. paracasei</i>
KIV (7)	<i>Lb.</i>			–	–	+	–	<i>Lb. plantarum</i>
KIV (8)	<i>Lb.</i>			–	–	–	–	N
KIV (9)	<i>Lb.</i>			+	+	–	–	<i>Lb. paracasei</i>
KIV (10)	<i>Lb.</i>			+	+	–	–	<i>Lb. paracasei</i>
KIV (11)	<i>Lb.</i>			–	–	–	+	<i>Lb. fermentum</i>
KIV (12)	<i>Lb.</i>			+	+	–	–	<i>Lb. paracasei</i>
KIV (13)	<i>Lb.</i>			+	+	–	–	<i>Lb. paracasei</i>
KIV (14)	<i>Lb.</i>			–	–	–	–	N
KIV (15)	<i>Lb.</i>			–	–	+	–	<i>Lb. plantarum</i>
KIV (16)	–	+	+					<i>O. oeni</i>
KIV (17)	<i>Lb.</i>			–	–	–	–	N
KIV (18)	<i>Lb.</i>			–	–	+	–	<i>Lb. plantarum</i>
KIV (19)	<i>Lb.</i>			–	–	+	–	<i>Lb. plantarum</i>
KIV (20)	<i>Lb.</i>			+	+	–	–	<i>Lb. paracasei</i>
KIV (21)	–	+	+					<i>O. oeni</i>
KIV (22)	<i>Lb.</i>			+	+	–	–	<i>Lb. paracasei</i>
KIV (23)	<i>Lb.</i>			–	–	+	–	<i>Lb. plantarum</i>
KIV (24)	<i>Lb.</i>			+	+	–	–	<i>Lb. paracasei</i>
KIV (25)	<i>Lb.</i>			+	+	–	–	<i>Lb. paracasei</i>
KIV (26)	<i>Lb.</i>			+	+	–	–	<i>Lb. paracasei</i>
KIV (27)	<i>Lb.</i>			+	+	–	–	<i>Lb. paracasei</i>
KIV (28)	<i>Lb.</i>			–	–	+	–	<i>Lb. plantarum</i>
KIV (29)	<i>Lb.</i>			–	–	+	–	<i>Lb. plantarum</i>
KIV (30)	–	+	+					<i>O. oeni</i>
KIV (31)	<i>Lb.</i>			+	+	–	–	<i>Lb. paracasei</i>

Pokračování Tabulka č. 14: Souhrnná tabulka rodové a druhové identifikace 39 bakteriálních kmenů

DNA kmene	Rodová identifikace	<i>Doména Bacteria</i>	<i>O. oeni</i>	<i>Lb. casei/paracasei</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>	Druhová identifikace
KIV (32)	–	+	+					<i>O. oeni</i>
KIV (33)	<i>Lb.</i>			–	–	–	+	<i>Lb. fermentum</i>
KIV (34)	<i>Lb.</i>			+	+	–	–	<i>Lb. paracasei</i>
KIV (35)	<i>Lb.</i>			–	–	–	–	N
KIV (36)	<i>Lb.</i>			–	–	–	–	N
KIV (37)	–	+	+					<i>O. oeni</i>
KIV (38)	<i>Lb.</i>			–	–	–	–	N
KIV (39)	<i>Lb.</i>			–	–	–	–	N

+....PCR produkt byl detekován

–....PCR produkt nebyl detekován

Pokud není uveden žádný znak, znamená to, že u daného kmene PCR nebyla provedena

N...neidentifikováno do žádného z testovaných druhů

=> Na základě druhově specifických PCR bylo do druhů zařazeno 32 kmenů KIV z celkového počtu 39 kmenů izolovaných během výroby vína. 7 kmenů identifikovaných jako kmeny rodu *Lactobacillus* nebylo na základě druhově specifických PCR zařazeno do druhů.

5.4. Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení při výrobě vína u jednotlivých odrůd

5.4.1. Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice

Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení vyskytujících se při výrobě vína u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice je znázorněno v Tabulce č. 15.

Tabulka č. 15: Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice

Den	Druh				
	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Neidentifikovaný druh rodu <i>Lactobacillus</i>
1	+	–	+	–	–
3	–	+	–	+	–
11	–	+	+	–	+
13	+	+	–	–	+
15	+	+	+	–	–
17	+	–	–	–	–
19	+	–	–	–	–

+ (KIVX).....druh byl v daný den detekován, v závorce je uvedeno označení kmene

–.....druh v daný den nebyl detekován

=> V prvních dnech (od 1. do 3. dne) výroby červeného vína Cabernet Moravia z ekologické vinice byly v moštu identifikovány bakteriální druhy *O. oeni*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* a *Lb. fermentum*. Od 11. do 15. byly v hroznovém moštu detekovány druhy *O. oeni*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* a bakterie rodu *Lactobacillus*, které nebyly na základě druhově specifické PCR zařazeny do žádného z testovaných druhů. Od 17. do 19. dne už byly v hroznovém moštu identifikovány pouze bakterie druhu *O. oeni*.

5.4.2. Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení u odrůdy Sauvignon z ekologické vinice

Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení vyskytujících se v hroznovém moštu při výrobě bílého vína odrůdy Sauvignon z ekologické vinice je uveden v Tabulce č. 16.

Tabulka č. 16: Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení u odrůdy Sauvignon z ekologické vinice

Den	Druh				
	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Neidentifikovaný druh rodu <i>Lactobacillus</i>
1	–	–	+ (KIV3)	–	–
3	+ (KIV5)	+ (KIV31)	+ (KIV4)	–	–
5	–	+ (KIV12)	+ (KIV18)	–	–
13	–	+ (KIV24)	–	–	–
15	–	+ (KIV27)	+ (KIV28)	–	+ (KIV38)
17	–	+ (KIV34)	–	+ (KIV33)	+ (KIV35)
19	+ (KIV37)	–	–	–	–

+ (KIVX).....druh byl v daný den detekován, v závorce je uvedeno označení kmene

–.....druh v daný den nebyl detekován

=> Na začátku alkoholové kvašení, tzn. od 1. do 5. dne výroby vína, byly v hroznovém moštu přítomny bakterie druhu *O. oeni*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*. Od 7. do 11. dne nebylo získáno počítatelné množství bakterií mléčného kvašení. Od 13. do 17. dne byly v hroznovém moštu detekovány bakterie *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum* a bakterie rodu *Lactobacillus*, které nebyly identifikovány. 19. den již byly v moštu identifikovány pouze bakterie druhu *O. oeni*.

5.4.3. Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení u odrůdy Sauvignon z integrované vinice

Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení vyskytujících se v hroznovém moštu při výrobě bílého vína odrůdy Sauvignon z integrované vinice je uveden v Tabulce č. 17.

Tabulka č. 17: Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení u odrůdy Sauvignon z integrované vinice

Den	Druh				
	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Neidentifikovaný druh rodu <i>Lactobacillus</i>
1	–	+ (KIV6)	+ (KIV7)	–	+ (KIV8)
3	–	+ (KIV9)	–	–	+ (KIV36)
5	–	+ (KIV13)	+ (KIV19)	–	+ (KIV14)
15	–	+ (KIV25)	+ (KIV29)	–	–

+ (KIVX).....druh byl v daný den detekován, v závorce je uvedeno označení kmene

–.....druh v daný den nebyl detekován

=> V prvních dnech alkoholového kvašení, tzn. od 1. do 5. dne, byly v moštu přítomny bakterie *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* a bakterie rodu *Lactobacillus*, které pomocí druhově specifické PCR nebyly identifikovány. Od 7. do 13. dne nebylo získáno počítatelné množství bakterií mléčného kvašení. 15. den byly v moštu detekovány bakterie *Lb. paracasei* a *Lb. plantarum*.

5.4.4. Srovnání druhového zastoupení bakterií mléčného kvašení u jednotlivých odrůd vína během alkoholového kvašení

Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení vyskytujících se v hroznovém moštu při výrobě jednotlivých odrůd vína je uvedeno v Tabulce č. 18.

Tabulka č. 18: Druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení při výrobě vína u jednotlivých odrůd

Den	Odrůda	Druh				
		<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Neidentifikovaný druh rodu <i>Lactobacillus</i>
1	CME	+ (KIV1)	–	+ (KIV2)	–	–
	SE	–	–	+ (KIV3)	–	–
	SI	–	+ (KIV6)	+ (KIV7)	–	+ (KIV8)
3	CME	–	+ (KIV10)	–	+ (KIV11)	–
	SE	+ (KIV5)	+ (KIV31)	+ (KIV4)	–	–
	SI	–	+ (KIV9)	–	–	+ (KIV36)
5	CME	–	–	–	–	–
	SE	–	+ (KIV12)	+ (KIV18)	–	–
	SI	–	+ (KIV13)	+ (KIV19)	–	+ (KIV14)
11	CME	–	+ (KIV26)	+ (KIV15)	–	+ (KIV39)
	SE	–	–	–	–	–
	SI	–	–	–	–	–
13	CME	+ (KIV16)	+ (KIV20)	–	–	+ (KIV17)
	SE	–	+ (KIV24)	–	–	–
	SI	–	–	–	–	–
15	CME	+ (KIV21)	+ (KIV22)	+ (KIV23)	–	–
	SE	–	+ (KIV27)	+ (KIV28)	–	+ (KIV38)
	SI	–	+ (KIV25)	+ (KIV29)	–	–
17	CME	+ (KIV30)	–	–	–	–
	SE	–	+ (KIV34)	–	+ (KIV33)	+ (KIV35)
	SI	–	–	–	–	–
19	CME	+ (KIV32)	–	–	–	–
	SE	+ (KIV37)	–	–	–	–
	SI	–	–	–	–	–

CME.....Cabernet Moravia z ekologické vinice
 SE.....Sauvignon z ekologické vinice
 SI.....Sauvignon z integrované vinice
 + (KIVX).....druh byl v daný den detekován, v závorce je uvedeno označení kmene
 -.....druh v daný den nebyl detekován

=> Druhovému zastoupení bakterií mléčného kvašení při výrobě vína se u jednotlivých odrůd lišilo. Zatímco u obou odrůd vína z ekologické vinice byly izolovány všechny identifikované druhy BMK (*O. oeni*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum*), u odrůdy bílého vína Sauvignon z integrované vinice pouze druhy *Lb. plantarum* a *Lb. paracasei*. *O. oeni*, bakterie převážně řídící malolaktické kvašení, nebyly u odrůdy Sauvignon z integrované vinice po celou dobu kvašení detekovány. U všech tří odrůd pak byly během alkoholového kvašení izolovány další bakterie rodu *Lactobacillus*, které nebyly zařazeny do žádného z testovaných druhů.

6. DISKUSE

6.1. Sledování počtu a druhového zastoupení bakterií mléčného kvašení u jednotlivých odrůd vína během alkoholového kvašení

Celkový počet bakterií mléčného kvašení, především pak bakterií rodu *Lactobacillus*, byl sledován od prvního po devětačtyřicátý den výroby vína u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice a odrůdy Sauvignon z integrované a ekologické vinice a to ve zvolených časových intervalech.

6.1.1. Srovnání celkového počtu bakterií mléčného kvašení u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice a odrůdy Sauvignon z ekologické a integrované vinice

U všech tří odrůd vína se počet bakterií mléčného kvašení na začátku alkoholového kvašení snižoval (viz 5.1.4., Graf č. 4). Tento jev byl pravděpodobně způsoben šířením a antagonismem kvasinek na populaci BMK. Je známo [48], že počet kolonietvorných buněk bakterií mléčného kvašení se na začátku výroby vína pohybuje v rozmezí od 10^2 do 10^4 CFU/ml, přičemž přídavek oxidu siřičitého, který se aplikuje za účelem potlačení nežádoucí mikroflóry, snižuje populaci BMK. Kvasinky, které jsou méně citlivé na šíření, naopak rychle rostou, množí se a zahajují alkoholové kvašení. Z literatury [31] vyplývá, že bakterie se nejen nemohou množit, ale jsou také částečně eliminovány kvasinkami, které během zrychleného růstu na začátku primárního kvašení ochuzují médium o aminokyseliny. Tyto jevy, společně s toxickými účinky metabolitů uvolněnými/produkovanými kvasinkami (např. mastné kyseliny, etanol, SO_2), brání množení BMK.

Nejvyšší počet bakterií mléčného kvašení jak na začátku, tak i v pozdější fázi alkoholového kvašení byl pozorován při výrobě červeného vína odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice (viz 5.1.4., Graf č. 4). U odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice byl počet BMK první den výroby vína $(7,25 \pm 0,50) \cdot 10^4$ CFU/ml, u odrůdy Sauvignon z ekologické vinice $(6,13 \pm 0,08) \cdot 10^3$ CFU/ml a u odrůdy Sauvignon z integrované vinice byl jejich počet $(7,43 \pm 0,28) \cdot 10^3$ CFU/ml (viz 5.1.4., Graf č. 4). První den byl tedy počet bakterií mléčného kvašení u odrůdy červeného vína Cabernet Moravia z ekologické vinice o řád vyšší oproti odrůdě bílého vína Sauvignon jak z ekologické, tak i z integrované vinice. Porovnáním odrůdy Sauvignon z ekologické a integrované vinice bylo zjištěno, že způsob pěstování vinné révy neměl výrazný vliv na počet BMK první den výroby vína.

V pozdější fázi primárního kvašení se pohyboval počet bakterií mléčného kvašení u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice v rozmezí $(5,88 \pm 0,06) \cdot 10^4$ až $(2,50 \pm 0,25) \cdot 10^6$ CFU/ml, u odrůdy Sauvignon z ekologické vinice $(3,03 \pm 0,25) \cdot 10^3$ až $(20,50 \pm 1,00) \cdot 10^3$ CFU/ml a u odrůdy Sauvignon z integrované vinice byly bakterie mléčného kvašení detekovány během alkoholového kvašení pouze patnáctý den a to v počtu $(5,83 \pm 1,58) \cdot 10^2$ CFU/ml (viz 5.1.4., Graf č. 4). Počet BMK v pozdější fázi výroby vína byl tedy o jeden až tři řády vyšší u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice oproti odrůdě Sauvignon z ekologické vinice. Srovnáním odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice a Sauvignon z integrované vinice, kde byly BMK detekovány pouze patnáctý den, byl jejich počet vyšší o čtyři řády u odrůdy Cabernet Moravia, kde se patnáctý den vyskytoval nejvyšší

počet bakterií mléčného kvašení. Při sledování vlivu způsobu pěstování vinné révy u odrůdy Sauvignon z ekologické a integrované vinice je patrné, že se BMK lépe vyvíjely u odrůdy z ekologické vinice. Bakterie mléčného kvašení byly detekovány u odrůdy z ekologické vinice od třináctého po devatenáctý den, u odrůdy z integrované vinice pouze patnáctý den, přičemž jejich počet byl o řád nižší ve srovnání s ekologickou vinicí.

Z těchto výsledků je tedy zřejmé, že nejvhodnějším „substrátem“ pro růst bakterií mléčného kvašení bylo červené víno odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice. Podle literatury [48] mohou mít určité technologické zásahy vliv na to, kdy a zda dojde k malolaktickému kvašení. Nakvašování, které se používá při výrobě červených vín, obecně zvyšuje frekvenci a rychlost sekundární fermentace. Přesné faktory nejsou známy, ale pravděpodobně zahrnují působení fenolů jako elektronových akceptorů v procesu oxidace sacharidů během alkoholového kvašení. Tento jev by tedy mohl vysvětlit proč se malolaktické kvašení častěji vyvíjí u červených vín (s dlouhou macerační dobou) než u vín bílých. Dalším faktorem, který má nepochybně vliv na lepší růst bakterií mléčného kvašení ve víně a tedy na vývoj malolaktického kvašení, je vyšší pH většiny červených vín oproti bílým vínům.

6.1.2. Srovnání druhového zastoupení bakterií mléčného kvašení u jednotlivých odrůd vína během alkoholového kvašení

U všech tří hroznových moštů (viz 5.11.4., Tabulka č. 18) byly na začátku alkoholového kvašení identifikovány bakterie mléčného kvašení rodu *Lactobacillus*. Bakterie *Oenococcus oeni*, převážně řídící malolaktické kvašení při výrobě vína, byla detekována na začátku výroby vína u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice a odrůdy Sauvignon z ekologické vinice. U odrůdy Sauvignon z integrované vinice bakterie *O. oeni* během celé výroby vína nebyly detekovány.

V pozdější fázi kvašení vína byly u odrůd Cabernet Moravia a Sauvignon z ekologické vinice identifikovány, jak bakterie rodu *Lactobacillus*, tak i bakterie *O. oeni*. V posledních dnech, kdy byly ještě ve víně bakterie detekovány, pak pouze bakterie *O. oeni*. U odrůdy Sauvignon z integrované vinice byly bakterie mléčného kvašení v pozdní fázi detekovány pouze patnáctý den, kdy byly v hroznovém moštu nalezeny opět pouze bakterie rodu *Lactobacillus*.

Z literatury [17, 31, 49, 50] vyplývá, že bakterie podléhají ve víně přírodní selekci. Zatímco až osm různých druhů bakterií mléčného kvašení může být zjištěno v hroznových moštích na začátku výroby vína, obvykle pouze jediný druh, *O. oeni*, může být izolován na konci alkoholového kvašení. Tento jev byl pozorován u odrůd Cabernet Moravia a Sauvignon z ekologické vinice. U odrůdy Sauvignon z integrované vinice, jak již bylo zmíněno, byly v pozdější fázi výroby detekovány BMK rodu *Lactobacillus*, tedy nikoliv *O. oeni*. Při výrobě vína se u jednotlivých odrůd lišilo i druhové zastoupení. Zatímco u obou odrůd z ekologické vinice byly izolovány všechny testované druhy BMK (*O. oeni*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum*), u odrůdy Sauvignon z integrované vinice z testovaných druhů pouze *Lb. plantarum* a *Lb. paracasei*. U všech tří hroznových moštů pak byly izolovány další bakterie rodu *Lactobacillus*, které nebyly zařazeny do žádného z testovaných druhů.

Je známo [17, 31, 49, 50], že mezi hlavní faktory vymezující růst bakterií ve víně patří teplota, pH a obsah etanolu. Výskyt a přežití bakterií rodu *Lactobacillus* ve víně je velmi závislé na pH a obsahu etanolu. Při vysoké hodnotě pH vína (>3,5) často tyto bakterie převažují, zatímco při nižších hodnotách pH dominují jiné bakterie mléčného kvašení jako je *Oenococcus oeni*. U jednotlivých druhů se liší etanolová tolerance. Například růst *Lb. plantarum* se zastavuje při koncentraci etanolu 5 – 6 obj. %, zatímco více etanolově tolerantní *Lb. casei* a *Lb. brevis* byly úspěšně použity pro indukci malolaktického kvašení. V našem případě u všech tří hroznových moštů byly bakterie *Lb. plantarum* detekovány naposledy patnáctý den. Následující dny už byla pravděpodobně koncentrace etanolu vyšší než 6 obj. %.

Podle literatury [17, 31, 49, 50] je tedy přírodní výběr ovlivněn především postupným zvyšováním obsahu etanolu během kvašení a dalších produktů metabolismu kvasinek. Jedná se především o mastné kyseliny, jako je kyselina kaprinová a laurová, které jsou silnými inhibitory bakteriálního růstu. Některé kvasinky mohou také produkovat značné množství SO₂ díky metabolismu sírných sloučenin. Kromě samotného zvýšení toxicity média pro bakterie mléčného kvašení, je v médiu nedostatek sloučenin dusíku. Nicméně tento nedostatek je pouze přechodný, protože kvasinky v závěrečné fázi alkoholového kvašení uvolňují vitamíny, dusíkaté báze, peptidy a aminokyseliny. Bakteriální druh *O. oeni* pravděpodobně nejlépe překonává tyto stresující podmínky růstu bakterií mléčného kvašení. Nicméně, některé druhy *Pediococcus* a *Lactobacillus* mohou také přežít, což bylo pozorováno u odrůdy Sauvignon z integrované vinice, kde byly patnáctý den detekovány bakterie rodu *Lactobacillus*, zatímco bakterie *O. oeni* nebyly detekovány po celou dobu výroby vína.

6.2. Kultivace bakterií pro izolaci DNA

Celkem 39 přečištěných a izolovaných bakteriálních kmenů z vína a 3 sbírkové kmeny rodu *Lactobacillus* byly kultivovány v tekutém MRS médiu. MRS médium je v literatuře [5] popsáno jak vhodné médium pro kultivaci bakterií mléčného kvašení z vína. Kultivace probíhala aerobně při teplotě 37 °C po dobu 24 až 48 hodin. Všechny kmeny narostly při aerobní kultivaci do dostatečné hustoty buněk pro izolaci DNA. U některých kmenů byl pozorován silnější a u některých slabší nárůst. Podle literatury [17] jsou bakterie rodu *Pediococcus* aerobní až mikroaerofilní, bakterie rodu *Oenococcus* fakultativně anaerobní a bakterie rodu *Lactobacillus* mikroaerofilní. V literatuře je popsána kultivace bakterií rodu *Lactobacillus* jak aerobní [43, 52] tak i anaerobní [5, 45].

Po nárůstu byly bakteriální kultury narostlé v tekutém MRS médiu rozočkovány metodou křížového roztěru na pevné MRS médium a kultivovány aerobně při 37 °C po dobu 24 až 48 hodin. Na miskách narostly kolonie smetanové až bílé, stejného tvaru, lesklé, neprůhledné a s pravidelným ohraničením.

6.3. Izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR

Pomocí agarosové gelové elektroforézy bylo zjištěno, že DNA z 39 izolovaných a přečištěných bakteriálních kmenů KIV a 3 sbírkových kmenů byla různé kvality. U 21 vzorků byla izolovaná DNA relativně intaktní, u 18 vzorků byla DNA degradována a u 3 vzorků nebyla DNA na gelu detekována. Nepřítomnost DNA na gelu byla

pravděpodobně způsobena nízkou koncentrací izolované DNA, jejíž přítomnost ve vzorku byla ověřena spektrofotometrickým stanovením koncentrace DNA, kdy byla měřena absorbance v rozsahu vlnových délek 220 – 320 nm. Koncentrace DNA bakteriálních kmenů se pohybovala v rozmezí 44,0 až 597,0 ng/μl. Takto velké rozdíly v koncentraci izolované DNA u jednotlivých kmenů byly pravděpodobně způsobeny rozdílným nárůstem kmenů při kultivaci v tekutém MRS médiu nebo nedokonalým zlyzováním buněčné stěny při izolaci DNA.

Čistota DNA byla stanovena z poměru hodnot absorbancí A_{260}/A_{280} . Pohybuje-li se hodnota poměru absorbancí A_{260}/A_{280} v rozmezí 1,8 – 2,0, lze DNA považovat za čistou. Pokud je tento poměr větší než 2,0 obsahuje vzorek RNA, přítomnost proteinů ve vzorku se projeví poklesem poměru pod hodnotu 1,8 [37]. Poměr absorbancí A_{260}/A_{280} u izolované DNA se pohyboval v rozmezí 1,545 až 1,930, což naznačuje, že některé vzorky obsahovaly zbytky proteinů.

Po změření koncentrace a čistoty byla izolovaná DNA naředěna na 10 ng/μl a použita pro polymerázové řetězové reakce.

6.4. Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus*

Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus* byla provedena jak s DNA uvolněnou lyzí buněk z jedné bakteriální kolonie, kdy byla kolonie resuspendována v PCR vodě a povařena, tak i s DNA izolovanou z hrubého lyzátu buněk fenolovou extrakcí. Pomocí rodově specifické PCR pro rod *Lactobacillus* z 1 bakteriální kolonie bylo zařazeno do rodu *Lactobacillus* 21 z celkového počtu 39 bakteriálních kmenů izolovaných z hroznových moštů během výroby vína, zatímco po amplifikaci DNA izolované fenolovou extrakcí to bylo 32 kmenů. Tyto rozdíly v rodově specifické PCR mohly být způsobeny špatným odebráním kolonie, kdy následnou lyzí buněk nebylo získáno dostatečné množství DNA pro amplifikaci nebo přítomností inhibitorů PCR, které se do vzorku mohly dostat z kultivačního média. Další možnou příčinou je nedostatečná lýze bakteriální kolonie povařením. Je známo, že buněčné stěny jednotlivých kmenů rodu *Lactobacillus* se mohou lišit a některé kmeny druhů rodu *Lactobacillus* se obtížně lyzují [53, 54]. Na základě rodově specifické PCR nebylo do rodu *Lactobacillus* zařazeno 7 bakteriálních kmenů (KIV1, KIV5, KIV16, KIV21, KIV30, KIV32 a KIV37).

6.5. PCR pro doménu *Bacteria*

PCR pro doménu *Bacteria* byla provedena za účelem ověření amplifikovatelnosti DNA a vyloučení přítomnosti inhibitorů PCR s bakteriálními kmeny (KIV1, KIV5, KIV16, KIV21, KIV30, KIV32 a KIV37), které pomocí rodově specifické PCR nebyly zařazeny do rodu *Lactobacillus*. Specifický amplikon 466 bp [40] byl detekován u všech sedmi testovaných bakteriálních kmenů, což vylučuje přítomnost inhibitorů PCR ve vzorcích DNA a potvrzuje amplifikovatelnost DNA. Pomocí doménově specifické PCR bylo prokázáno, že tyto kmeny patří do domény *Bacteria* avšak do jiného rodu než *Lactobacillus*.

6.6. Druhově specifické PCR

Bylo provedeno 5 druhově specifických PCR pro zařazení 39 bakteriálních kmenů, izolovaných z hroznových moštů během výroby vína, do druhu *O. oeni*, skupiny *Lb. casei/paracasei*, dále do druhů *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* a *Lb. fermentum*.

Druhově specifická PCR pro druh *O. oeni* byla provedena se 7 bakteriálními kmeny, které na základě rodově specifické PCR nebyly zařazeny do rodu *Lactobacillus* a u nichž byla amplifikovatelnost DNA ověřena pomocí doménově specifické PCR. Specifický amplikon 1025 bp [42] byl detekován u všech 7 testovaných bakteriálních kmenů. Na základě toho byly testované kmeny zařazeny do druhu *O. oeni*.

Do skupiny *Lb. casei/paracasei* bylo pomocí druhově specifické PCR zařazeno 13 bakteriálních kmenů z celkového počtu 32 kmenů, identifikovaných jako kmeny rodu *Lactobacillus*, u nichž byly amplifikovány dva specifické produkty PCR o velikosti 400 a 200 bp [46].

Těchto 13 bakteriálních kmenů zařazených do skupiny *Lb. casei/paracasei* bylo následně pomocí druhově specifické PCR, kdy byl amplifikován specifický produkt PCR o velikosti 290 bp [43], identifikováno jako *Lb. paracasei*.

Při druhově specifické PCR pro druh *Lb. plantarum* byl amplifikován specifický produkt PCR o velikosti 318 bp [44] u 10 bakteriálních kmenů identifikovaných jako kmeny rodu *Lactobacillus*. Do druhu *Lb. fermentum* byly na základě druhově specifické PCR [45] zařazeny 2 bakteriální kmeny.

Dle publikovaných výsledků patří mezi nejčastější druhy bakterií mléčného kvašení izolovaných z vína *O. oeni*, z druhů rodu *Lactobacillus* pak *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum* a *Lb. hilgardii*, z rodu *Pediococcus* bývá v hroznových moštích přítomný *P. parvulus* a *P. pentosaceus* [5, 31, 55]. Výsledky získané v této práci jsou ve shodě s publikovanými výsledky.

Na základě druhově specifické PCR bylo do druhů zařazeno celkem 32 bakteriálních kmenů. U žádného z testovaných kmenů nebyla detekována zkřížená reakce. Pomocí druhově specifické PCR nebylo zařazeno celkem 7 KIV kmenů, identifikovaných jako kmeny rodu *Lactobacillus*, do žádného z testovaných druhů.

7. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo monitorování celkového počtu bakterií mléčného kvašení vyskytujících se v hroznovém moštu během alkoholového kvašení. Studie byla provedena u odrůdy červeného vína Cabernet Moravia z ekologické vinice a odrůdy bílého vína Sauvignon z ekologické a integrované vinice.

Nejvyšší počet bakterií mléčného kvašení jak na začátku, tak i v pozdější fázi primární fermentace se vyskytoval u odrůdy červeného vína Cabernet Moravia z ekologické vinice. U odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice byl první den počet BMK $(7,25 \pm 0,50) \cdot 10^4$ CFU/ml zatímco u odrůdy Sauvignon z ekologické vinice $(6,13 \pm 0,08) \cdot 10^3$ CFU/ml a u odrůdy Sauvignon z integrované vinice byl počet bakterií mléčného kvašení první den $(7,43 \pm 0,28) \cdot 10^3$ CFU/ml. V pozdější fázi alkoholového kvašení se počet BMK u odrůdy Cabernet Moravia z ekologické vinice pohyboval v rozmezí $(5,88 \pm 0,06) \cdot 10^4$ až $(2,50 \pm 0,25) \cdot 10^6$ CFU/ml, u odrůdy Sauvignon z ekologické vinice $(3,03 \pm 0,25) \cdot 10^3$ až $(20,50 \pm 1,00) \cdot 10^3$ CFU/ml a u odrůdy Sauvignon z integrované vinice byly bakterie mléčného kvašení detekovány během alkoholového kvašení pouze patnáctý den a to v počtu $(5,83 \pm 1,58) \cdot 10^2$ CFU/ml. Z experimentálních výsledků, srovnáním červené a bílé odrůdy vína z ekologické vinice, tj. odrůd se stejným způsobem pěstování vinné révy, vyplývá, že nejvhodnějším prostředím pro růst bakterií mléčného kvašení byla odrůda červeného vína Cabernet Moravia. Při posouzení vlivu způsobu pěstování a tedy porovnáním odrůdy bílého vína Sauvignon z ekologické a integrované vinice, bylo zjištěno, že se počet BMK první den alkoholového kvašení u odrůd výrazně nelišil. Nicméně v pozdější fázi primární fermentace bakterie jablečno-mléčného kvašení lépe rostly u odrůdy bílého vína z ekologické vinice.

Dalším cílem práce byla rodová a druhová identifikace izolovaných 39 bakteriálních kmenů (KIV1 – KIV39). Na základě rodově specifické PCR pro rod *Lactobacillus* bylo z 39 izolovaných bakteriálních kmenů do rodu *Lactobacillus* zařazeno 32 kmenů. U 7 kmenů, které nebyly zařazeny do rodu *Lactobacillus*, byla provedena doménově specifická PCR pro doménu *Bacteria* za účelem ověření amplifikovatelnosti DNA. Těchto 7 bakteriálních kmenů bylo následně pomocí druhově specifické PCR identifikováno jako kmeny druhu *Oenococcus oeni*, bakterie převážně řídící malolaktické kvašení. Kmeny zařazené do rodu *Lactobacillus* byly následně identifikovány pomocí 4 druhově specifických PCR pro skupinu *Lb. casei/paracasei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* a *Lb. fermentum*, tj. pro druhy, které patří mezi nejčastěji izolované z hroznového moštu během alkoholového kvašení. Z 32 bakteriálních kmenů rodu *Lactobacillus* bylo zařazeno 13 kmenů do druhu *Lb. paracasei*, 10 kmenů do druhu *Lb. plantarum*, 2 kmeny do druhu *Lb. fermentum* a 7 kmenů nebylo na základě druhově specifické PCR zařazeno do žádného z testovaných druhů.

Následně bylo posuzováno druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení v hroznovém moštu během alkoholového kvašení u jednotlivých odrůd. Zatímco u obou odrůd z ekologické vinice byla bakterie *O. oeni* izolována na začátku i na konci alkoholového kvašení, u odrůdy Sauvignon z integrované vinice tato bakterie nebyla detekována během celé výroby vína. Z bakterií rodu *Lactobacillus* byly během alkoholového kvašení hroznového moštu opět u obou odrůd z ekologické vinice izolovány všechny testované druhy, tj. *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* a *Lb. fermentum*, u odrůdy Sauvignon z integrované vinice pak pouze

Lb. plantarum a *Lb. paracasei*. U všech odrůd pak byly ještě detekovány bakterie rodu *Lactobacillus*, které na základě PCR nebyly zařazeny do žádného z testovaných druhů. Porovnáním jednotlivých odrůd bylo zjištěno, že způsob pěstování vinné révy má vliv na druhové zastoupení bakterií mléčného kvašení vyskytujících se v hroznovém moštu během alkoholového kvašení.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. TEMMERMAN, R., HUYS, G., SWINGS, J.: Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science and technology*, 2004, vol. 15, pp. 348 – 359.
2. FLEET, G. H.: Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, vol. 50, pp. 101 – 117.
3. ALEXANDRE, H., COSTELLO, P. J., REMIZE, F., GUZZO, J., GUILLOUX – BENATIER, M.: *Saccharomyces cerevisiae* – *Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Mikrobiology*, 2004, vol. 93, pp. 141-154.
4. CARRETE, R., TERESA VIDAL, M., BORDONS, A., CONSTANTI, M.: Inhibitory effect of sulfur dioxide and other compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS MICROBIOLOGY letters*, 2002, vol. 211, pp. 155-159.
5. RODAS, A., FERRER, S., PARDO, I.: 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bakteria Isolated from Grape Must and Wine. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, vol. 26, pp. 412 – 422.
6. *Bergey's Manual Trust* [online]. Last revision 20th of June [cit. 7. 11. 2010]. Dostupné z: <<http://www.bergeys.org/index.html>>
7. Malolactic Fermentation [online]. 2002 [cit. 2010-09-24]. Dostupný z WWW: <<http://www.brsquared.org/wine/Articles/MLF/MLF.htm>>.
8. MINÁRIK, E., NAVARA, A.: *Chémia a mikrobiológia vína*. 1. vyd. Bratislava, 1986. s. 85 - 403.
9. ŠILHÁNKOVÁ, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: Akademie věd České republiky, 2002. s. 83-115. ISBN 8-85605-71-6.
10. KLABAN, V.: *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005. s. 654. ISBN 80-7262-341-9.
11. HUDECOVÁ, D., MAJTÁN, V.: *Mikrobiológia I*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľství STU, 2002. s. 189. ISBN 80-227-1663-4.
12. Vrtiška, O.: Neviditelní kouzelníci. *Časopis ABC* [online]. 9. 7. 2001, č. 14 [cit. 2010-09-27]. Dostupné z: <<http://abc.blesk.cz/clanek/casopis-abc/2214/neviditelni-kouzelnici.html>>.
13. BABULA, P.: *Archebakterie, bakterie, houby, protista*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, 2009. s. 144. ISBN 978-80-7305-057-3.
14. VODRÁŽKA, Z, ŽDÁRSKÝ, J, DEMNEROVÁ, K. *Biochemie a mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1985. s. 294. ISBN 05-090-85.

15. ADAMS, M. R., MOOS, M. O.: *Food Microbiology*. 2nd ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. 479 s. ISBN 0-85404-611-9.
16. CAPLICE, E., FITZGERALD, G. F.: Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, vol. 50, pp. 131 – 149.
17. OSBORNE, J., EDWARDS, CH.: Bacteria important during winemaking. *ADVANCES IN FOOD AND NUTRITION RESEARCH*, 2005, vol. 50, pp. 140 - 177.
18. POOLMAN, B., MOLENAAR, D., SMID, E. J., UBBINK, T., ABEE, T., RENAULT, P. P., KONINGS W. N.: Malolactic fermentation: Electrogenic Malate Uptake and Malate/Lactate Antiport Generate Metabolit Energy. *Journal of Bacteriology*, 1991, vol. 173, pp. 6030 – 6037.
19. SALEMA, M., POOLMAN, B., LOLKEMA, J. S., DIAS, M. C., KONINGS, W. N.: Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*. *European Journal of Biochemistry*, 1994, vol. 225, pp. 289 – 295.
20. SALEMA, M., LOLKEMA, J. S., SAN RAMAO, M. V., LOUREIRO-DIAS, M. C.: The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation. *Journal of bacteriology*, 1996, vol. 178, pp. 3127 – 3132.
21. KADLEC, P.: *Technologie potravin II*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. s. 182-189. ISBN 80-7080-510-2.
22. VALICOVÁ, M. *Mikrobiologie vína*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 54 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
23. ČEPIČKA, J. A KOL.: *Obecná potravinářská technologie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995. 246 s. ISBN 80-7080-239-1.
24. MINÁRIK, E., NAVARA, A.: *Chémia a mikrobiológia vína*. 1. vyd. Bratislava, 1986. s. 85-403.
25. PELIKÁN, M., DUDÁŠ, F., MÍŠA, D.: *Technologie kvasného průmyslu*. 1. vyd. Brno: MZLU, 1996. 129 s. ISBN 80-715-7240-3.
26. Svaz integrované a ekologické produkce hroznů a vína *EKOVÍN* [online]. 2006, 13. dubna 2010 [cit. 2010-10-15]. Dostupné z [www: <http://www.ekovin.cz/ekovin>](http://www.ekovin.cz/ekovin).
27. Biotechnologický portál *Gate2Biotech* [online]. 14. 8. 2007 [cit. 2010-10-15], ISSN 1802-2685 Dostupné z: [<http://www.gate2biotech.cz/pruvodce-biospotrebitele-biovino/>](http://www.gate2biotech.cz/pruvodce-biospotrebitele-biovino/).
28. FUGELSANG, K. C., EDWARDS, CH. G. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. 2nd ed. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2007. 393 p. ISBN 0-387-33341-X.

29. *The Microscopy Facility* [online]. Utah State University, [cit. 2010-09-27]. Dostupný z WWW: <<http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>>.
30. DICKS, L. M. T., DELLAGLIO, F., COLLINS, M. D.: Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, vol. 45, pp. 395 – 397.
31. RIBÉREAU-GAYON, P., DUBOURDIEU, D., DONÉCHE, B., LONRAUD, A.: *The Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2nd ed. England, Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2000, vol. 1, 250 p. ISBN 0-471-97362-9.
32. FLEET, G. H.: *Wine: Microbiology and Biotechnology*. 2nd ed. New York: CRC Press, 1993. 510 p. ISBN 0-415-27850-3.
33. FLEET, G. H.: Yeasts interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, vol. 86, pp. 11-22.
34. Králová, B., Fukal, L., Rauch, P., Ruml, T.: *Bioanalytické metody*. Praha: VŠCHT: Praha, 2007. 254 s. ISBN 978-807080-449-3.
35. ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P.: *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998.
36. ČIKOŠ, Štefan, et al. *Polymarázová reťazová reakcia a jej použitie v biologickom výskume a diagnostike*. Košice: Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, 2001. 203 s. ISBN 80-968618-0-8.
37. ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B.: *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*, 1. vyd., Brno: Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
38. BRUCE, A., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P.: *Základy buněčné teorie (Essential Cell Biology)*. Ústí nad Labem, Espero Publishing, s.r.o., 1998. 630 s. ISBN 80-902906-0-4.
39. DEMNEROVÁ, K. A KOL.: *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2001, 179 s.
40. HAARMAN, M., KNOL, J.: Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, vol. 72 (4), pp. 2359 – 2365. (bacteria)
41. DUBERNET, S., DESMASURES, N., GUÉGUEN, M.: A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, pp. 271 – 275.
42. ZAPPAROLI, G., TORRIANI, S., PESENTE, P., DELLAGLIO, F.: Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and

- detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Letters in Applied Microbiology*, 1998, vol. 27, pp. 243 – 246.
43. WARD L. J. H., TIMMINS M. J.: Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters of Applied Microbiology*, 1999, vol. 29, pp. 90 – 92. (paracasei)
 44. TORRIANI, S., FELIS, G. E., DELLAGLIO, F.: Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with recA Gene-Derived Primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, vol. 67, pp. 3450 – 3454.
 45. CHAGNAUD, P., MACHINIS, K., COUTTE, L. A., MARECAT, A., MERCENIER, A.: Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, vol. 44, pp. 139 – 148.
 46. WALTER, J., TANNOCK, G. W., TILSALA-TIMISJARVA, A., RODTONG, S., LOACH, D. M., MUNRO, K., ALATOSSAVA, T.: Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, pp. 297 – 303.
 47. BOTES, A., TODOROV, S. D., MOLLENDORFF, J. W., BOTHA, A., DICKS, L. M. T.: Identification of lactic acid bacteria and yeasts from boza. *Process Biochemistry*, 2007, vol. 42, pp. 267 – 270.
 48. JACKSON, R. S.: *Wine Science: Principles, Practice, Perception*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2000. 645 p. ISBN 012379062X.
 49. LONVAUD-FUNEL, A.: Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, vol. 126, pp. 209 – 214.
 50. LONVAUD-FUNEL, A.: Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1999, vol. 76, pp. 317 – 331
 51. MINÁRIK, E.: Fermentácia a štýl vín z príkrych svahov vinohradov. *Vinařský obzor*. 2008, č. 5, s. 236.
 52. DESAI, A. R., SHAH, N. P., POWELL, I. B.: Discrimination of Dairy Industry Isolated of the *Lactobacillus casei* Group. *Journal of Dairy Science*, 2006, vol. 89, pp. 3345 – 3351.
 53. DELCOUR, J., FERAIN, T., DEGHORAIN, M., PALUMBO, E., HOLS, P.: The biosynthesis and functionally of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1999, vol. 76, pp. 159 – 184.
 54. TURKOVÁ, K.: *Využití metod amplifikace DNA při identifikaci bakterií rodu Lactobacillus*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2009. 106 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

55. CAÑAS, P. M. I., PÉREZ, P. R., PRIETO, S. S., HERREROS, M. L. P.: Ecological study of lactic acid microbiota isolated from Tempranillo wines of Castilla-La Mancha. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, vol. 108, pp. 220 – 224.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AFLP	polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů
ASVK	aktivní sušené vinné kvasinky
BMK	bakterie mléčného kvašení
bp	pár bází (base pair)
CCM	Česká sbírka mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms)
CFU	počet kolonietvorných jednotek (colony forming unit)
dATP	deoxyadenintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
dTTP	deoxythymintrifosfát
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
<i>L.</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
mRNA	mediátorová RNA
MRS	Mann, Rogosa, Sharpe (MRS médium)
<i>O.</i>	<i>Oenococcus</i>
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
PCR	polymerázové řetězová reakce
RAPD	náhodná amplifikace polymorfní DNA
Rep-PCR	interrepetitivní PCR
RFLP	polymorfizmus délky restričních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina

<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
SDS	dodecylsulfát sodný
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris-HCl	Tris-hydroxymethyl-aminomethan hydrochlorid
tRNA	transferová RNA

10. PŘÍLOHY

Část výsledků byla publikována ve formě abstraktu a bude prezentována formou posteru na konferenci *Chemistry and Life* ve dnech 14. – 16. září 2011 v Brně.

Occurrence of lactic acid bacteria in grape must during alcoholic fermentation

Markéta Valicová, Jiřina Omelková, Štěpánka Trachtová,
Alena Španová

*Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická,
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno
xvalicova@fch.vutbr.cz*

Winemaking can be summarized as the biotransformation of must into wine, which is carried out principally by *Saccharomyces cerevisiae* strains during the primary, i.e. alcoholic, fermentation. A secondary fermentation, the so-called malolactic fermentation (MLF), assures biodeacidification that is also often encouraged, since it improves wine stability and quality. Malolactic fermentation usually takes place after alcoholic fermentation, but may also occur simultaneously with the primary fermentation. During the fermentation, lactic acid bacteria metabolize malic acid to form lactic acid and CO₂¹. Strain of lactic acid bacteria isolated from wine belong to the genera *Lactobacillus*, *Oenococcus* and *Pediococcus*, although MLF is largely controlled by *Oenococcus oeni*².

The aim of this work was to monitor the total number of lactic acid bacteria occurring in grape must during wine production. The study was performed on the white wine grape variety Sauvignon from both organic and integrated vineyards. The isolation of pure cultures of lactic acid bacteria from mixed cultures and subsequently their identification by polymerase chain reaction (PCR) was also subject of the thesis. Of the total number of 24 purified bacterial strains isolated during the alcoholic fermentation, 22 strains were identified into the genus *Lactobacillus* by the genus-specific PCR and the remaining 2 strains as species *Oenococcus oeni* by the species-specific PCR. Subsequently, from 22 bacterial strains of the genus *Lactobacillus* 9 strains were classified as *Lbc. paracasei*, 7 strains as *Lbc. plantarum*, and 1 strain as *Lbc. fermentum*.

The remaining 5 strains have not been identified into species yet.

Then, the analysis explored the effect of the way of wine growing (organic and integrated) on species representations of lactic acid bacteria in grape must during the primary fermentation. The experimental results show that the method of wine growing had an impact on both the number of viable cells as well as the species representation of lactic acid bacteria during the alcoholic fermentation of grape must. Whereas on the first day of alcoholic fermentation the number of lactic acid bacteria did not differ significantly, in the later stage of primary fermentation lactic acid bacteria developed better in the variety from organic vineyard. Similarly, the species representation varied; in the variety from organic vineyard were isolated all four tested species, while in the variety from integrated vineyard were isolated only two.

REFERENCES

1. ALEXANDRE, H., COSTELLO, P. J., REMIZE, F., GUZZO, J., GUILLOUX – BENATIER, M.: *Saccharomyces cerevisiae* – *Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Mikrobiology*, 2004, vol. 93, pp. 141-154.
2. CARRETE, R., TERESA VIDAL, M., BORDONS, A., CONSTANTINI, M.: Inhibitory effect of sulfur dioxide and other compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS MICROBIOLOGY letters*, 2002, vol. 211, pp. 155-159.